

ANA CLÁUDIA BOARETO DA COSTA CESAR

**EFEITOS DOS ANTIMALÁRICOS ARTESUNATO E MEFLOQUINA
SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FETAL EM
RATOS**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em
Farmacologia, Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas
da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter

CURITIBA - PR

2012



PARECER

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada: “EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DOS ANTIMALÁRICOS ARTESUNATO E MEFLOQUINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FETAL EM RATOS WISTAR”, de autoria da pós-graduanda **ANA CLÁUDIA BOARETO DA COSTA CESAR**, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter e banca composta pelos professores: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter (Presidente - Farmacologia - UFPR), Prof.^a Dr.^a Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR), Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade (Fisiologia – UFPR), Prof.^a Dr.^a Eliane Dallegrave (Farmacologia e Toxicologia – UFCSPA) e Prof.^a Dr.^a Rosana Nogueira de Moraes (Fisiologia – UFPR) reuniu-se e de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 04 de outubro de 2012.

Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter (Presidente - Farmacologia - UFPR)

Prof.^a Dr.^a Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR)

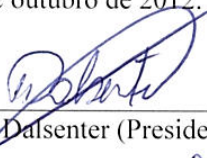
Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade (Fisiologia – UFPR)

Prof.^a Dr.^a Eliane Dallegrave (Farmacologia e Toxicologia – UFCSPA)

Prof.^a Dr.^a Rosana Nogueira de Moraes (Fisiologia – UFPR)

ATA DO JULGAMENTO DA 15ª DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

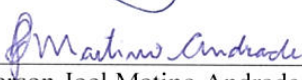
Ao quarto dia do mês de outubro do ano de dois mil e doze, às quatorze horas, no Anfiteatro nº10 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, de autoria da pós-graduanda **ANA CLÁUDIA BOARETO DA COSTA CESAR** intitulada: “EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DOS ANTIMALÁRICOS ARTESUNATO E MEFLOQUINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FETAL EM RATOS WISTAR”, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter e banca composta pelos professores: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter (Presidente - Farmacologia - UFPR), Prof.^a Dr.^a Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR), Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade (Fisiologia – UFPR), Prof.^a Dr.^a Eliane Dallegrave (Farmacologia e Toxicologia – UFCSPA) e Prof.^a Dr.^a Rosana Nogueira de Moraes (Fisiologia – UFPR). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos e a candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida arguida durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: APROVADA. De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi aprovada. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por seu orientador. Nada mais havendo a tratar, o Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pelo Presidente e pelos demais membros da banca examinadora, em Curitiba, 04 de outubro de 2012.



Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter (Presidente - Farmacologia - UFPR)



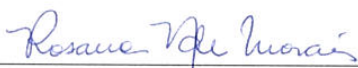
Prof.^a Dr.^a Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR)



Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade (Fisiologia – UFPR)



Prof.^a Dr.^a Eliane Dallegrave (Farmacologia e Toxicologia – UFCSPA)



Prof.^a Dr.^a Rosana Nogueira de Moraes (Fisiologia – UFPR)

Dedico este trabalho aos meus pais, **Osvaldo** e **Marita**, sempre atenciosos e disponíveis; ao meu marido **Juarez**, cujo amor e incentivo possibilitaram a realização desse trabalho; à minha filha **Luiza**, minha “melhor amiga para sempre”; aos meus anjinhos, **Francisco** e **Antônio**, que também fizeram parte dessa jornada; e ao meu **bebê**, um lindo presente de conclusão do doutorado.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter**, pela orientação e amizade demonstradas em cada ensinamento e conselho;

Aos meus colegas de laboratório **Ana Carolina Lourenço, Caroline Gomes, Emerson Botelho Lourenço, Inês Rabitto, Fabíola Nihi e Samanta de Araújo** pelo auxílio na realização dos experimentos e pelo companheirismo, amizade e momentos de descontração; em especial à **Juliane Centeno Müller**, pelo mútuo aprendizado, no campo profissional e pessoal;

Às alunas de iniciação científica **Bruna Minatovicz, Marina Vechi e Natália Lombardi**, pelo auxílio e envolvimento neste projeto;

Ao **Prof. Dr. Francisco J. R. Paumgarten**, pela acolhida no Laboratório de Toxicologia da FIOCRUZ, pelos treinamentos nas análises teratológicas e pela dedicação demonstrada na discussão e redação do primeiro artigo apresentado nessa tese;

À **Prof. Dra. Flávia Sant'Anna Rios**, pelo grande auxílio nas análises histopatológicas e pela prontidão e carinho com que sempre me recebeu para a discussão dos resultados;

À **Prof. Dra. Rosana Nogueira de Moraes**, pela realização das análises hormonais;

Aos funcionários do **Biotério** do Setor de Ciências Biológicas da UFPR;

Aos professores, funcionários e colegas do **Departamento de Farmacologia** da Universidade Federal do Paraná;

À FIOCRUZ/PDTIS, particularmente ao **Dr. Jorge Souza Mendonça**, pelo fornecimento das drogas utilizadas nesse projeto;

Aos meus pais, **Oswaldo** e **Marita**, pelos valores, pelos exemplos e pelos ensinamentos que levarei por toda a vida; e aos meus irmãos e cunhadas, **Luiz** e **Dai**, **Zeca** e **Jaque**, que sempre me apoiaram e acreditaram na conclusão desse trabalho;

Aos meus sogros, **Juarez** e **Nilva**, pelo grande auxílio, principalmente nos momentos de correria;

Ao meu marido **Juarez** que sempre me incentivou e apoiou com enorme carinho;

À **Luiza**, minha filha, que desde pequenininha aprendeu a conviver com a mamãe "estudante";

À **FUNPAR** e **CAPES** pelo apoio financeiro; e

À **Deus**, meu criador, pelas bênçãos e proteção.

Muito Obrigada!

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança
brincando a beira-mar, divertindo-me em descobrir
uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita
que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade
continua misterioso diante de meus olhos”.*

Isaac Newton

RESUMO

A malária é uma das doenças infecciosas mais severas e potencialmente letais, sendo particularmente severa e letal quando a infecção ocorre durante a gestação. A terapia antimalárica durante a gestação deve ser iniciada prontamente, sendo assim, a toxicidade reprodutiva das drogas antimaláricas e de suas associações é área de pesquisa de extrema relevância. Seus parasitas, em particular o *Plasmodium falciparum*, vêm se tornando resistentes ao tratamento convencional, com isso, a terapia antimalárica está a cada dia mais dependente do uso dos derivados da artemisinina. A Organização Mundial da Saúde recomenda que combinações contendo derivados da artemisinina (ACTs) sejam a terapia de escolha em casos de malária *falciparum*, principalmente em áreas de resistência. Uma das combinações antimaláricas mais eficientes é a administração de artesunato associado à mefloquina. O artesunato é um derivado semissintético da artemisinina que, *in natura*, é encontrada nas folhas e flores da *Artemisia annua* L. O artesunato é um antimalárico potente e de ação rápida, sendo raros os casos de parasitas resistentes. Estudos clínicos e não-clínicos sobre a segurança das ACTs no primeiro trimestre de gestação são raros. Uma preocupação é a possibilidade de interações aditivas ou antagônicas entre as drogas. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade da associação artesunato/mefloquina sobre o desenvolvimento embrionário e fetal em ratos. Para tanto, ratas prenhas foram tratadas por via oral com diferentes doses de artesunato (15 e 40 mg/kg/dia), de mefloquina (30 e 80 mg/kg/dia) e da associação artesunato/mefloquina (15/30 e 40/80 mg/kg/dia) nos dias gestacionais 9 a 11. Dois experimentos foram realizados, o primeiro foi desenvolvido para a avaliação da ação teratológica e letalidade do artesunato e da mefloquina e de sua associação sobre os fetos no dia gestacional 20. No segundo estudo as progenitoras foram eutanasiadas no dia gestacional 12 para avaliações de perdas embrionárias pós-implantação, parâmetros de toxicidade materna, viabilidade e histopatologia embrionária e análises hormonais das progenitoras. O tratamento com artesunato e com a associação artesunato/ mefloquina, em ambas as doses avaliadas, e com a mefloquina na dose de 30 mg/kg/dia não induziu toxicidade materna. O tratamento com mefloquina na dose de 80 mg/kg/dia prejudicou o ganho de massa corporal das progenitoras logo após o tratamento, indicando toxicidade materna. As dosagens de progesterona e testosterona plasmáticas das progenitoras não resultaram em alterações no balanço hormonal no dia gestacional 12 em todos os grupos avaliados. A administração de artesunato nas doses de 15 e 40 mg/kg/dia e da associação artesunato/mefloquina nas doses de 15/30 mg/kg/dia e 40/80 mg/kg/dia induziram efeitos deletérios, tanto sobre os embriões no dia de gestação 12, quanto sobre os fetos no dia 20 de gestação, sendo observada maior letalidade nas ninhadas avaliadas no dia gestacional 20. A exposição dos embriões à mefloquina isolada, em ambas as doses avaliadas, não resultou em alterações teratológicas nos fetos no dia gestacional 20, no entanto, uma progenitora do grupo exposto à maior dose de mefloquina (80 mg/kg/dia) teve perda total da ninhada. Nas avaliações histopatológicas, a exposição à mefloquina isolada induziu hidrocefalia em 20% dos embriões avaliados, sem outras alterações histopatológicas. Malformações e atrasos de ossificação no esqueleto, causadas pela exposição dos embriões ao artesunato, foram significativos quando este foi administrado isolado ou em associação com a mefloquina, no entanto, a exposição à associação resultou em um decréscimo nas anomalias quando comparadas ao artesunato isolado. Os

principais efeitos observados sobre os ossos após a exposição de artesunato isolado ou em associação foram malformação nas costelas e ossos longos e ossificação incompleta das esternébras e ossos pélvicos. Os efeitos histopatológicos observados (marcante redução de eritroblastos embrionários primitivos, morte celular e alteração estrutural do coração e fígado) também foram observados com maior intensidade nos animais expostos ao artesunato isolado quando comparados com os animais expostos à associação artesunato/mefloquina, indicando uma ação protetora da mefloquina sobre os efeitos embriotóxicos do artesunato. Da mesma maneira, os efeitos observados após a administração da mefloquina isolada (toxicidade materna, perda total de ninhada e hidrocefalia) não foram observados quando esta foi administrada em associação com o artesunato. A associação artesunato/mefloquina é efetiva e indispensável para o tratamento antimalárico, mas a exposição na gestação pode induzir perdas pós-implantação e malformações. Nas doses avaliadas no presente estudo, a exposição ao artesunato induziu embrioletalidade e alterações teratológicas e histopatológicas nas ninhadas. A exposição à mefloquina resultou em redução do ganho de massas das progenitoras e hidrocefalia. Os resultados da associação artesunato/mefloquina sugerem que os efeitos tóxicos de ambos os antimaláricos são atenuados quando administrados em associação. Os mecanismos pelos quais ocorre essa interação ainda estão sob investigação.

Palavras-chave: Artesunato; Mefloquina; Antimaláricos; Malária; Teratologia; Histopatologia; Toxicidade Reprodutiva; Ratos Wistar; Prenhez.

ABSTRACT

Malaria is one of the most severe and potentially lethal mosquito-borne parasitic disease. Besides affecting a number of women in childbearing age in endemic areas, malaria has proved to be particularly severe and lethal when infection occurs during pregnancy. Antimalarial drug therapy during pregnancy therefore has to be promptly initiated making safety of currently available drugs and their combination for mothers and their babies a research topic of paramount relevance. Parasites, particularly *Plasmodium falciparum*, have become resistant to conventional drugs and thus malaria therapy has more and more relied on the use of artemisinins and on combination of drugs containing artemisinin derivatives. One of the most effective antimalarial drug combination therapies is the co-administration of mefloquine and artesunate. Artesunate, dihydroartemisinin (DHA), artemether and arteether are semi-synthetic derivatives of artemisinin that, in nature, is found in leaves and flowers of *Artemisia annua* L. Since artemisinins are potent and rapidly acting drugs to which there have been few cases of resistance, they have become one of the most important groups of drugs available to treat malaria. The World Health Organization has recommended that artemisinin-containing combination therapies (ACTs) should be used to treat *Plasmodium falciparum* in areas of drug resistance. Non-clinical and clinical studies on the safety of antimalarial drug combinations during first trimester of pregnancy have seldom been performed. A major concern regarding safety of ACTs in pregnancy is the possibility of harmful additive or antagonist interactions between the drugs. The objective of this study was to provide data on the developmental toxicity of a combination of artesunate and mefloquine in the rat. Pregnant rats were treated orally with different doses of artesunate (15 and 40 mg/kg/day), mefloquine (30 and 80 mg/kg/day) and artesunate plus mefloquine (15/30 and 40/80 mg/kg/day) on gestational day 9 to 11. Two experiments were performed, the first study was developed to evaluate the teratology effects of artesunate and mefloquine and their association, for that the dams were euthanized on gestational day 20. In the second experiment the dams were euthanized on gestational day 12 for evaluations of embryonic losses, viability and histopathology, maternal toxicity and hormonal balance. The treatment with artesunate and with the combination artesunate plus mefloquine, in both evaluated doses, and with mefloquine 30 mg/kg/day did not result in maternal toxicity. The treatment with mefloquine 80 mg/kg/day induced reduction on maternal body weight gain just after the treatment, indicating maternal toxicity. Maternal plasmatic progesterone and testosterone did not indicate anomalies in the hormonal balance in all the evaluated groups. The exposition of artesunate 15 and 40 mg/kg/day and the combination artesunate plus mefloquine 15/30 and 40/80 mg/kg/day induced toxic effects on embryos on gestational day 12 and fetuses on gestational day 20 with higher mortality on gestational day 20. The embryos exposition to mefloquine, in both evaluated doses, did not result in teratological anomalies on gestational day 20, however, there was one litter total loss after exposition of mefloquine (80 mg/kg/day). In the histopathology evaluations, mefloquine alone induced few cases of hydrocephalus on embryos on gestational day 12, without other histopathology alterations. The effects of the artesunate exposition on the embryos bones was significant when it was administered isolated or in combination with mefloquine, although, the association exposition resulted in fewer malformations when compared to isolated artesunate. The most relevant skeletal effects observed with the artesunate exposition were ribs and long bones

malformations and incomplete ossification of sternebrae and pelvic bones. The histopathologic effects observed (reduction or lack of primitive embryonic erythroblasts, cell death and irregular architecture of heart and liver) were also observed more intensely on the embryos exposed to isolated artesunate than the exposed to the combination artesunate plus mefloquine, indicating a protective action of mefloquine on the artesunate toxic effects. Likewise, the effects observed after the administration of mefloquine alone (maternal toxicity, total litter loss and hydrocephalus) were not observed when the mefloquine was administered in combination with artesunate. The combination artesunate plus mefloquine is effective and necessary for antimalarial treatment, but exposure during pregnancy may lead to post-implantation losses and malformations. In the doses evaluated in this study, exposure to artesunate induced embryoletality and teratology and histopathology alterations in litters. Exposure to mefloquine resulted in reduction of the maternal weight gain, stillbirth and hydrocephalus. The results of the combination of artesunate plus mefloquine administration suggest that the toxicity of both antimalarials is attenuate when they are combined. The mechanisms through which this interaction occurs are still under investigation.

Keywords: Artesunate; Mefloquine, Antimalarials; Malaria; Teratology; Histopathology; Reproductive Toxicity; Wistar rats; Pregnancy.

APRESENTAÇÃO

Esta tese está apresentada na forma de dois artigos:

1. **Study on the developmental toxicity of combined artesunate and mefloquine antimalarial drugs on rats;**
2. **Effects of the combined artesunate and mefloquine antimalarial drugs on rat embryos.**

No capítulo 5 (Materiais, métodos e resultados) os materiais e metodologia utilizados, resultados, discussão, conclusões e referências encontram-se em cada artigo e representam a íntegra desse trabalho. Para melhor visualização dos resultados das análises histopatológicas e teratológicas relatadas nos artigos, após o término de cada artigo está incluído o material complementar deste, tabelas expandidas dos resultados e figuras das principais alterações encontradas.

Na tese, o capítulo 6 (Discussão) apresenta comentários gerais a respeito dos resultados obtidos nos dois artigos. No capítulo 7 (Conclusões) são apresentadas as conclusões gerais da tese. As listas de figuras, siglas, símbolos e abreviaturas e as referências referem-se ao conteúdo apresentado na Introdução, Revisão de Literatura e Discussão da tese, assim como dos materiais complementares do capítulo 5.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	<i>Anopheles sp.</i> Mosquito vetor da malária.....	22
FIGURA 2	Eritrócito contaminado por <i>Plasmodium falciparum</i>	22
FIGURA 3	Mapa das regiões de risco de transmissão de malária no Brasil..	24
FIGURA 4	Percentual de casos de malária no Brasil por <i>Plasmodium falciparum</i> no período de 1999 a 2009.....	25
FIGURA 5	<i>Artemisia annua</i> L.....	28
FIGURA 6	Estrutura química da artemisinina, DHA e artesunato.....	29
FIGURA 7	Estrutura química da mefloquina.....	36
FIGURA 8	<i>Graphic abstract</i>	83
FIGURA 9	Malformações esquelética induzidas pelo artesunato.....	92
FIGURA 10	Avaliação macroscópica da viabilidade embrionária e vascularização da vesícula vitelínica.....	131

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Anomalias externas observadas nos fetos expostos ao artesunato, à mefloquina e à associação artesunato/mefloquina nos dias gestacionais 9-11.....	84
TABELA 2	Anomalias viscerais observadas nos fetos expostos ao artesunato, à mefloquina e à associação artesunato/mefloquina nos dias gestacionais 9-11.....	85
TABELA 3	Retardo de ossificação observado nos fetos expostos ao artesunato, à mefloquina e à associação artesunato/mefloquina nos dias gestacionais 9-11.....	87
TABELA 4	Alterações e variações de ossificação observados nos fetos expostos ao artesunato, à mefloquina e à associação artesunato/mefloquina nos dias gestacionais 9-11.....	89
TABELA 5	Massa dos órgãos das progenitoras, no dia gestacional 12, após tratamento com artesunato, mefloquina e associação artesunato/mefloquina nos dias 9-11 de gestação.....	130

LISTA DE SIGLAS

AC	Acre
AM	Amazonas
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDTIS	Programa para Desenvolvimento Tecnológico de Insumos de Saúde
PNCM	Programa Nacional de Controle da Malária
RO	Rondônia

LISTA DE ABREVIATURAS

ACT	<i>Artemisinin-based combination therapy</i> (terapia combinada com derivados da artemisinina)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DHA	Dihidroartemisinina
g	Gramma
kg	Quilograma
MDR1	Multiple drug resistance
mg	Miligrama
mL	Mililitro
PMAA	Peso metabólico do animal modelo
PMM	Peso metabólico do modelo
SERCA	Retículo sarcoendoplasmático Ca^{+2} ATPase
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	MALÁRIA.....	22
2.1.1	Tratamento da malária por <i>Plasmodium falciparum</i>	25
2.1.2	Malária e gravidez.....	26
2.2	ARTEMISININA E SEUS DERIVADOS.....	27
2.2.1	Artesunato.....	29
2.2.2	Mecanismo de ação.....	30
2.2.3	Toxicidade reprodutiva.....	31
2.2.3.1	Estudos em humanos.....	31
2.2.3.2	Estudos em animais.....	33
2.3	MEFLOQUINA.....	35
2.3.1	Mecanismo de ação.....	37
2.3.2	Toxicidade reprodutiva.....	38
2.3.2.1	Estudos em humanos.....	38
2.3.2.2	Estudos em animais.....	39
2.3.3	Utilização como profilaxia antimalárica em gestantes e mulheres em idade fértil.....	40
2.4	ASSOCIAÇÃO ARTESUNATO/MEFLOQUINA.....	41
3	HIPÓTESES E PREDIÇÕES.....	43
4	OBJETIVOS.....	44
4.1	OBJETIVO GERAL.....	44
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
5	MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS.....	45
5.1	ESCOLHA DOS MEDICAMENTOS E DOSES UTILIZADOS.....	45
5.2	CÁLCULO DOS ÍNDICES HISTOPATOLÓGICOS.....	47
5.3	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	49
5.4	ARTIGO 1.....	50
5.4.1	Material complementar.....	82
5.4.1.1	<i>Highlights</i>	82

5.4.1.2	<i>Graphic abstract</i>	83
5.4.1.3	Tabelas e figuras complementares.....	84
5.5	ARTIGO 2.....	94
5.5.1	Material complementar.....	129
5.5.1.1	Tabelas e figuras complementares.....	129
6	DISCUSSÃO GERAL	132
6.1	Toxicidade materna.....	132
6.2	Letalidade embrionária e fetal.....	133
6.3	Alterações morfológicas/estruturais nos embriões e fetos.....	135
6.4	Associação artesunato/mefloquina.....	140
7	CONCLUSÕES	142
	REFERÊNCIAS	143

1 INTRODUÇÃO

Doença infecciosa, com maior incidência nos países tropicais, a malária é causada pelo protozoário *Plasmodium* e transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*. A forma mais grave da doença é causada pelo *Plasmodium falciparum* (AVERY *et al.*, 2002), o qual é responsável também pelas formas mais comuns de resistência aos antimaláricos, reduzindo a eficácia do tratamento (ALKADI, 2007). A administração simultânea de múltiplas drogas (terapia combinada) é utilizada para combater o desenvolvimento de resistência, evitando a sobrevivência de parasitas mutantes com resistência a uma única droga (WHITE, 1998).

A malária é reconhecida como um grave problema mundial. Estima-se que em 2010 mais de três bilhões de pessoas foram expostas ao risco de contrair esta doença. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) ocorreram aproximadamente 216 milhões de casos de malária com 655.000 mortes no ano de 2010 (WHO, 2011). No Brasil foram registrados 300.000 novos casos de malária no ano de 2008, destes, 18,6% por *Plasmodium falciparum* (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

A infecção por *Plasmodium falciparum* na gravidez é relacionada com severas consequências para a mãe e para o feto. A infecção placentária, caracterizada pelo sequestro tecidual de plasmódios pela placenta, é considerada um grave problema de saúde pública por comprometer a nutrição fetal, resultando em restrição do crescimento intrauterino, nascimento prematuro, natimortos e baixo peso ao nascimento, além de maior incidência materna de malária cerebral e anemia e aumento de mortalidade materna e fetal (MCGREADY *et al.*, 1998; WHO, 2004; MORRIS *et al.*, 2011). Na África subsaariana, a malária gestacional é responsável por 20% dos casos de baixo peso ao nascimento e consequência de 100.000 mortes de crianças por ano (DESAI *et al.*, 2007).

A toxicidade de um antimalárico é apenas um dos lados na equação risco-benefício para a administração de um fármaco, e pode ter peso diferente, caso a droga seja utilizada para o tratamento da malária ou para sua profilaxia. Além disso, a margem terapêutica para alguns antimaláricos é estreita, podendo ocorrer maior toxicidade em grupos onde a cinética dos medicamentos pode estar alterada, como na gestação (LUZZI; PETO, 1993).

A artemisinina, extraída das folhas e flores da *Artemisia annua* L., e seus derivados semissintéticos têm sido utilizados para o tratamento da malária desde sua descoberta, na China, na década de 1970 (HIEN; WHITE, 1993). Estes compostos são sesquiterpenos lactonas, contendo uma ponte peróxido, que é necessária para a sua atividade antimalárica (MESHNICK; TAYLOR; KAMCHONWONGPAISAN, 1996). A dihidroartemisinina (DHA) é o principal metabólito ativo de diversos derivados da artemisinina, incluindo o artesunato, que é o éster succinato de dihidroartemisinina (CLARK, 2009). Por serem antimaláricos efetivos, de ação rápida e com poucos casos de resistência ao redor do mundo (LIM *et al.*, 2009; ROGERS *et al.*, 2009; WONGSRICHANALAI; MESHNICK, 2008), os derivados da artemisinina se tornaram o grupo mais importante de drogas para o tratamento da malária da atualidade. A OMS recomenda a associação com derivados da artemisinina (ACT - *Artemisinin-based combination therapy*) como tratamento de primeira linha contra malária *falciparum* no segundo e terceiro trimestres de gestação (WHO, 2010). No Brasil a utilização de derivados da artemisinina foi adotada como estratégia terapêutica de primeira escolha para o tratamento de malária por *Plasmodium falciparum* a partir de 2006 e os dois derivados da artemisinina utilizados são o artesunato e o artemeter (MS, 2010b).

A mefloquina, antimalárico produzido em 1963 pelo *Walter Reed Institute for Medical Research*, foi utilizada pela primeira vez para tratamento da malária *falciparum* resistente à cloroquina na Tailândia. Este fármaco é um 4-quinolinometanol, quimicamente relacionado com a quinina (SCHMIDT *et al.*, 1978). Atualmente, a mefloquina é recomendada para uso oral na profilaxia da malária, em monoterapia; e para quimioterapia da malária *falciparum* em associação com o artesunato (SCHLAGENHAUF, 1999; WHO, 2010).

A associação dos antimaláricos artesunato e mefloquina é, atualmente, tratamento de primeira escolha para malária *falciparum* em diversos países e a segurança e a eficácia dessa associação já está bem estabelecida (AMBLER *et al.*, 2009; NOSTEN; PRICE, 1995; PRICE *et al.*, 1997; RIBEIRO; OLLIARO, 1998). No entanto, os estudos são realizados, em sua maior parte, em pacientes não grávidas, restando dúvidas sobre a sua segurança na gestação.

A toxicidade reprodutiva pré-clínica do artesunato e da mefloquina foi estudada isoladamente. O principal efeito encontrado nos estudos realizados com o artesunato é o aumento na letalidade embrionária e fetal, com perda total das

ninhadas nas maiores doses (CLARK *et al.*, 2008a; CLARK *et al.*, 2004; WHITE *et al.*, 2006; WHITE; CLARK, 2008). Alguns estudos mostraram malformações em tecidos moles e esqueleto em ninhadas expostas durante o período pré-natal nas mesmas doses onde houve letalidade embrionária, sem indícios de toxicidade materna (CLARK *et al.*, 2008a; CLARK *et al.*, 2004). Estudos em ratos indicam que o período de maior toxicidade é entre os dias 10 a 14 de prenhez. Dentro desta janela, o dia 10 de prenhez é o mais sensível para efeitos teratogênicos e do dia 11 o mais sensível para embrioletalidade (WHITE, 2008). O mecanismo de toxicidade reprodutiva dos derivados da artemisinina em ratos foi investigado por diferentes laboratórios. Esses estudos demonstraram que os eritroblastos embrionários são o alvo primário desses compostos em embriões de ratos expostos *in vivo* (LONGO *et al.*, 2006a; LONGO *et al.*, 2006b; WHITE *et al.*, 2006). A hipótese proposta é que o evento inicial de redução de células vermelhas e a anemia associada levam à subsequente embrioletalidade ou dano celular, causando anormalidades cardíacas, miopatias, atraso no desenvolvimento e malformações ósseas (WHITE *et al.*, 2006). Em humanos, não há evidência de teratogenicidade ou mutagenicidade com a administração de artesunato (MCGREADY *et al.*, 2001; WHO, 2006a), no entanto os dados são limitados e os estudos publicados até o momento são insuficientes para assegurar o risco-benefício da utilização dessa droga, principalmente no primeiro trimestre de gestação (DELLICOUR *et al.*, 2007).

Devido à falta de dados conclusivos em humanos e às evidências de embrioletalidade e dismorfogênese observadas em estudos pré-clínicos, os derivados da artemisinina não são recomendados para tratamento de malária no primeiro trimestre de gestação (WHO, 2010). No entanto, em áreas de *Plasmodium falciparum* com múltipla resistência aos outros antimaláricos, mulheres grávidas necessitam ser tratadas com derivados da artemisinina, pois essas se tornaram as únicas drogas efetivas.

Resultados de estudos em mulheres expostas aos derivados da artemisinina durante a gestação, incluindo um pequeno número no primeiro trimestre, não demonstraram aumento de letalidade embrionária ou recém-natos com malformações evidentes (MCGREADY *et al.*, 1998; MCGREADY; NOSTEN, 1999).

Encontram-se descritos na literatura poucos estudos sobre o uso de mefloquina em humanos ou em animais durante o período gestacional, no entanto, nos últimos anos, o número de trabalhos sobre a toxicologia da mefloquina tem

crescido consideravelmente devido ao fato de seu uso ter aumentado com o surgimento de cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina. A mefloquina é amplamente prescrita na profilaxia antimalárica para viajantes provenientes de áreas não endêmicas (WHO, 2006b). A mefloquina, em doses terapêuticas, por via oral, geralmente é bem tolerada, ocorrendo mais frequentemente vômitos (ALKADI, 2007; PALMER; HOLLIDAY; BROGDEN, 1993; PHILLIPS-HOWARD; WOOD, 1996; WARD *et al.*, 2007). Outro efeito adverso decorrente do uso da mefloquina é neurotoxicidade e este medicamento não deve ser prescrito como profilaxia em pacientes com depressão ativa, história recente de depressão, transtorno de ansiedade generalizada, psicose, histórico de convulsões e outros transtornos psiquiátricos (TOOVEY, 2009). Efeitos sobre o sistema nervoso central que requerem hospitalização (convulsões e alucinações) ocorrem em 1:10.000 pacientes que utilizam a mefloquina como profilaxia contra a malária (ALKADI, 2007). Os riscos sobre o uso da mefloquina durante a gestação, na profilaxia ou tratamento da malária, não foram completamente avaliados, assim como de outros antimaláricos. Estudos sobre o uso da mefloquina durante o segundo e terceiro trimestres de gestação demonstraram um aumento na incidência de natimortos com o seu uso (MCGREADY *et al.*, 2000; NOSTEN *et al.*, 1999). Em ensaios pré-clínicos, a exposição à mefloquina demonstrou ser teratogênica em doses maiores que a dose recomendada para uso em humanos (PALMER *et al.*, 1993). Embora a maioria dos estudos aponte para a segurança e poucos efeitos adversos para a mãe ou para o feto, são necessários estudos mais aprofundados sobre a toxicologia reprodutiva da mefloquina (NOSTEN; HIEN; WHITE, 1998; WARD *et al.*, 2007).

Estudos sobre a segurança das ACTs são realizados, em sua maioria, em pacientes não grávidas. Existem poucos trabalhos sobre a toxicologia reprodutiva dos derivados da artemisinina e suas associações, avaliando possíveis ações aditivas ou antagônicas entre as drogas. Uma exceção é o estudo conduzido por Clark *et al.* (2004) sobre a toxicologia reprodutiva da associação dos antimaláricos clorproguanil-dapsona e artesunato (1:1,25:2) em ratos e coelhos. Os resultados desse estudo não demonstraram evidências de um efeito de proteção ou potencialização com a utilização da associação em relação à utilização do artesunato isolado (CLARK *et al.*, 2004).

Em 2006, a OMS publicou uma avaliação sobre a segurança dos derivados da artemisinina na gestação e recomendou estudos mais detalhados sobre as possíveis interações dos derivados da artemisinina e os antimaláricos associados (WHO, 2006a). De acordo com a OMS (2006a), como os derivados da artemisinina são usados em associação com outros antimaláricos, a possibilidade de interações deve ser levada em consideração.

Infecções por *Plasmodium falciparum* são perigosas tanto para a mãe como para o feto, sendo o tratamento eficaz de extrema importância. A associação artesunato-mefloquina representa um tratamento altamente eficiente e é importante determinar a segurança dessa associação durante a gestação. A gestação é associada com alterações na farmacocinética de diversas drogas, e, no caso específico dos derivados da artemisinina, como os eritroblastos embrionários são potenciais alvos dessas drogas, as interações podem não ser observadas em pacientes não-grávidas. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a toxicologia dos antimaláricos artesunato e mefloquina e de sua associação sobre o desenvolvimento de embriões e fetos de ratos expostos *in vivo* durante os dias 9 a 11 de prenhez.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MALÁRIA

A malária, do latim *mal ária* (mau ar), ou paludismo, *palus* (região úmida, pantanosa) é uma doença parasitária, transmitida pela picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles* (FIGURA 1). Existem quatro principais espécies de parasitas da malária que infectam humanos, *Plasmodium falciparum* (FIGURA 2), *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*. No Brasil não há registros de casos de malária por *Plasmodium ovale* (MS, 2009). Recentemente têm sido reportadas infecções com *Plasmodium knowlesi* no sudeste da Ásia (ASHLEY *et al.*, 2006).



FIGURA 1: *Anopheles* sp. MOSQUITO VETOR DA MALÁRIA.

Fonte: WHO, 10 Fact on malaria, CDC/James Gathany, *on line* (2009).

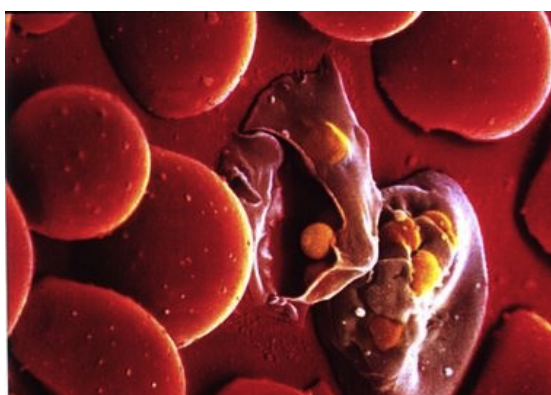


FIGURA 2: ERITRÓCITO CONTAMINADO POR *Plasmodium falciparum*.

Fonte: Stockbower, *on line* (2006).

A gravidade da doença é influenciada pela espécie infectante, sendo o *Plasmodium falciparum* responsável pelas formas mais graves da doença e a maioria das mortes. Esta espécie também é a mais encontrada na maioria das áreas endêmicas, com exceção da Índia e América do Sul, onde o *Plasmodium vivax* é mais comum (WHO, 2011).

A malária é uma doença infecciosa febril aguda, caracterizada por febre alta acompanhada de calafrios, suores e cefaleia. O desenvolvimento das manifestações clínicas da malária varia dependendo da espécie de *Plasmodium*, da carga parasitária e das condições imunológicas do hospedeiro (WHO, 2011). Crianças e gestantes podem apresentar as manifestações mais graves da doença (BRABIN; PIPER, 1997; DEEN; VON SEIDLEIN, 2002).

Esta doença está distribuída principalmente em áreas tropicais, África abaixo do Saara, sudeste Asiático, Ilhas do Pacífico, Índia e Américas do Sul e Central. Cerca de 80% dos casos e aproximadamente 90% das mortes por malária ocorrem na África, onde crianças e mulheres grávidas são os indivíduos mais severamente acometidos por esta doença (SACHS; MALANEY, 2002; WHO, 2011).

No último relatório da OMS foi relatado que a incidência mundial da malária tem diminuído, sendo que, em mais da metade dos 99 países com áreas de transmissão da malária houve uma redução considerável no número de casos da doença no período de 2000 a 2010 (WHO, 2011). Ainda assim, em muitos países, o número de casos de malária ainda é crescente, principalmente devido ao surgimento de resistência aos fármacos antimaláricos e inseticidas, e às alterações sociais e do meio ambiente (GREENWOOD; MUTABINGWA, 2002; WHO, 2011).

No Brasil a incidência de malária ocorre principalmente na região da Amazônia Legal, onde são registrados cerca 99.9% dos casos (FIGURA 3). Esta região possui características socioeconômicas, geográficas e ecológicas altamente favoráveis à interação do *Plasmodium* com o *Anopheles*, constituindo uma área de alto risco de infecção. Na região amazônica o principal mosquito transmissor da doença no Brasil, *Anopheles darlingi*, encontra suas condições ideais de crescimento: água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo (MS, 2009).

O registro de casos desta doença cresceu gradativamente no período de 2003 a 2005, mesmo após a implantação em 2003 do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) pelo Ministério da Saúde. Esse aumento deve-se, em

grande parte, à intensa e desordenada ocupação das periferias das capitais Manaus (AM) e Porto Velho (RO) e no município de Cruzeiro do Sul (AC), sendo que esses municípios concentraram cerca de um quarto dos casos de malária da região neste período. O desmatamento para extração de madeira, criação de gado, agricultura e assentamentos não oficiais também contribuem para o aumento da transmissão da doença. Outro fator colaborador é o aumento dos criadouros do mosquito vetor da malária em função da atividade de piscicultura, com a construção de tanques artificiais (MS, 2009).

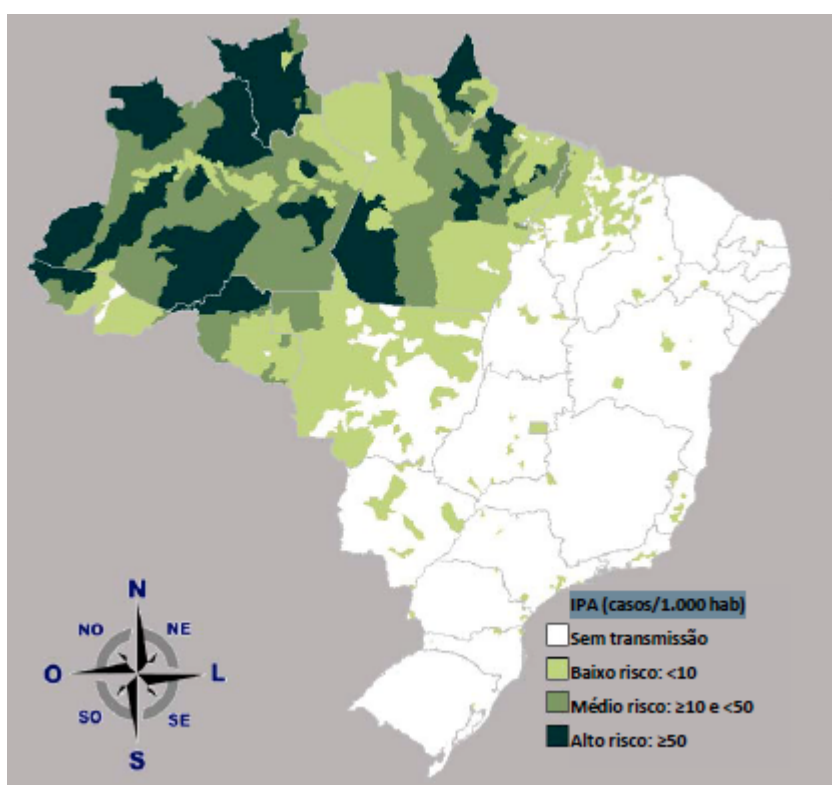


FIGURA 3: MAPA DAS REGIÕES DE RISCO DE TRANSMISSÃO DE MALÁRIA NO BRASIL
Fonte: Ministério da Saúde (2011).

Por outro lado, fora da Amazônia as condições não são muito favoráveis à interação dos fatores que determinam a endemicidade da malária, por exemplo, a região Sul do Brasil é considerada área de baixo risco para malária, porém conserva o potencial malarígeno que dá origem à transmissão eventual, como a presença do mosquito transmissor (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

Atualmente, tem sido registrada uma diminuição da incidência de malária no Brasil. No período de 2005 a 2009 houve uma redução de quase 50% nos casos

de malária no país (MS, 2010a). O número de casos pelo *Plasmodium falciparum*, número de mortes, hospitalizações e outros fatores também foram reduzidos neste período (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; WHO, 2011). O início da terapia combinada com derivados da artemisinina no Brasil em 2006 foi um fator importante na redução de casos desta doença (FIGURA 4). Entretanto, a avaliação dos riscos inerentes a este tipo de terapia é extremamente necessária, especialmente durante a gestação.

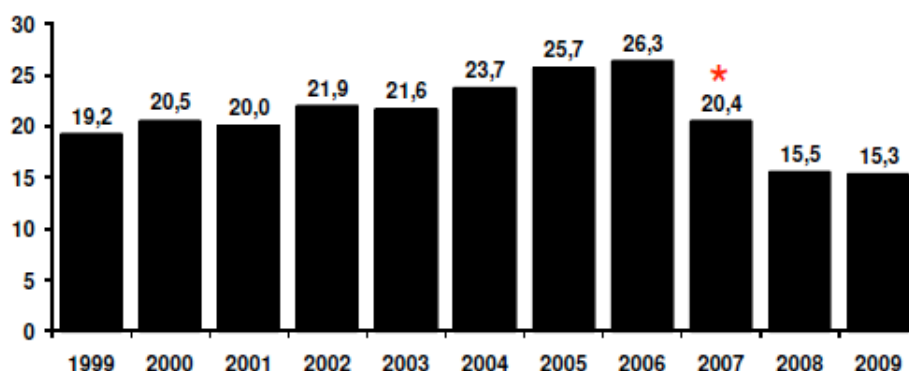


FIGURA 4: PERCENTUAL DE CASOS DE MALÁRIA NO BRASIL POR *Plasmodium falciparum* NO PERÍODO DE 1999 A 2009. *Marca o início do tratamento com a terapia combinada com derivados da artemisinina.
Fonte: Oliveira-Ferreira *et al.* (2010).

2.1.1 Tratamento da malária por *Plasmodium falciparum*

O número de medicamentos viáveis para o tratamento da malária por *Plasmodium falciparum* é baixo, principalmente devido ao surgimento de formas resistentes do parasita à maioria dos antimaláricos (WHO, 2006a).

O tratamento da malária visa principalmente à interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção. Também é objetivo da terapêutica a erradicação de formas latentes do parasita no ciclo tecidual, evitando-se as recaídas tardias. A abordagem terapêutica em pacientes residentes em áreas endêmicas pode também visar à interrupção da transmissão, pelo uso de drogas que eliminam as formas sexuadas dos parasitos. Para alcançar esses objetivos, diversas drogas, com diferentes mecanismos de

ação são utilizadas, tentando impedir o desenvolvimento do parasita no hospedeiro (MS, 2010b).

As principais drogas utilizadas hoje no Brasil para o tratamento da malária por *Plasmodium falciparum* são: Artemeter-Lumefantrina (Coartem®) ou a associação fixa de Artesunato-Mefloquina (MS, 2010b).

Desde 2001 a OMS considera a associação de medicamentos, principalmente utilizando derivados de artemisinina (*artemisinins combination therapy* – ACTs), como a terapia ideal para reduzir o aparecimento de cepas resistentes de *Plasmodium falciparum* (WHO, 2011). Os derivados da artemisinina são os medicamentos com ação mais potente e rápida contra a malária (NOEDL, 2005). Para reduzir a incidência de resistência, evitar recidivas da doença e acelerar a resposta terapêutica, esses medicamentos normalmente são utilizados em associações com outras drogas, como a mefloquina, amodiaquina e lumefantrina (WILAIRATANA *et al.*, 2002). A meia-vida curta e a utilização em associação da artemisinina e seus derivados dificultam o surgimento de cepas resistentes a esses medicamentos.

Em 2010 todos os 80 países que tem casos de malária por *Plasmodium falciparum* adotaram oficialmente a terapia com ACTs como tratamento de primeira linha para esta doença, e o número de tratamentos com ACTs instituídos neste ano foi de aproximadamente 181 milhões (WHO, 2011). Recentemente, a OMS recomendou ainda que o uso dos derivados da artemisinina como monoterapia seja abolido em todos os países, devido ao surgimento e disseminação de resistência aos medicamentos. Apesar disso, a monoterapia com derivados da artemisinina ainda é utilizada em 25 países. Embora tenha sido confirmada resistência do *Plasmodium falciparum* a artemisinina na fronteira do Camboja com a Tailândia em 2009, a terapia combinada utilizando estes fármacos ainda é considerada pela OMS como altamente eficaz (WHO, 2011).

2.1.2 Malária e gravidez

A infecção de malária durante a gravidez é um dos maiores problemas de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais no mundo. As consequências da malária durante a gestação incluem anemia, nascimentos com baixo peso, morte intrauterina, nascimentos prematuros, morte da mãe por malária severa,

transmissão vertical da doença, alta mortalidade infantil e problemas no desenvolvimento da criança. O risco de mulheres grávidas desenvolverem malária cerebral é de duas a três vezes maior que mulheres não grávidas residentes na mesma área (WHO, 2004). Na África subsaariana, a malária gestacional é responsável por 20% dos casos de baixo peso ao nascimento e consequência de 100.000 mortes de crianças por ano (DESAI *et al.*, 2007).

Por ser uma doença letal, durante a gravidez a malária deve ser tratada independente do potencial teratogênico do medicamento (BIALEK; KNOBLOCH, 1999). Diversos países, incluindo o Brasil, adotaram como primeira ou segunda linha no tratamento contra a malária a utilização de ACTs e, conseqüentemente, mulheres grávidas estão mais expostas a esses medicamentos; muitas mulheres serão expostas à ACTs no primeiro trimestre da gestação antes de estarem conscientes da gravidez (WHO, 2006b).

Derivados de artemisinina são drogas consideradas seguras, mas os estudos são feitos, na maioria das vezes, em pacientes não grávidas e apesar de não haver evidências sobre teratogenicidade ou mutagenicidade em grávidas tratadas os dados são considerados insuficientes (DELLICOUR *et al.*, 2007).

Em 2005 especialistas da OMS concluíram que os derivados da artemisinina poderiam ser utilizados no segundo e terceiro trimestres de gestação, na ausência de outra alternativa viável (WHO, 2006a). O tratamento da malária com derivados da artemisinina no primeiro trimestre de gestação só é aceito em caso de risco de vida materna, devido aos indícios de reabsorções embrionárias em animais de laboratório (WHO, 2006a). Estudos complementares têm confirmado os efeitos embriotóxicos da artemisinina e seus derivados em animais (BOARETO *et al.*, 2008; CLARK *et al.*, 2008b; CLARK *et al.*, 2004; LONGO *et al.*, 2006b). No entanto, não há comprovação sobre a possibilidade desses dados serem extrapolados para humanos, havendo uma necessidade urgente de se estabelecer a segurança dessa classe de medicamentos na gravidez.

2.2 ARTEMISININA E SEUS DERIVADOS

A artemisinina é extraída da planta *Artemisia annua* L. (FIGURA 5), utilizada na China há mais de 2.000 anos (VAN AGTMAEL; EGGELTE; VAN BOXTEL, 1999). Este composto é produzido nas folhas e se acumula nas inflorescências da

Artemisia annua, podendo ser extraído de ambos em concentração que varia entre 0,01 a 0,8% do peso seco. A baixa concentração de artemisinina extraída é uma grande limitação para a produção em larga escala, e um dos fatores do alto custo da medicação (GUPTA *et al.*, 1996).



FIGURA 5: *Artemisia annua* L.
Fonte: Yaris, *on line* (2004).

A artemisinina e seus derivados semissintéticos, dihidroartemisinina (DHA), artesunato, artemeter, arteeter e artelinato formam o grupo mais importante de medicamentos antimaláricos da atualidade. A artemisinina (FIGURA 6) é um sesquiterpeno trioxana lactona com ponte peróxido. A ponte peróxido é essencial para a atividade antimalárica (HIEN; WHITE, 1993). A lactona pode ser reduzida facilmente, resultando em DHA (FIGURA 6-2), que possui atividade antimalárica maior que a artemisinina (AVERY *et al.*, 2002).

A artemisinina e a DHA são pouco solúveis em água e óleo, sendo utilizadas sob a forma de comprimidos e supositórios. Devido à insolubilidade da artemisinina, impedindo sua administração parenteral, foram desenvolvidos derivados semissintéticos mais solúveis (HAYNES; KRISHNA, 2004). O artesunato (FIGURA 6-3), hidrossolúvel, e o artemeter, lipossolúvel, foram desenvolvidos por cientistas chineses, para administração intravenosa e intramuscular, respectivamente. O arteeter, lipossolúvel, foi desenvolvido pela OMS, e o artelinato, hidrossolúvel, pelo *Walter Reed Army Institute of Research* (Walter Reed Instituto de Pesquisa do Exército) (VAN AGTMAEL *et al.*, 1999).

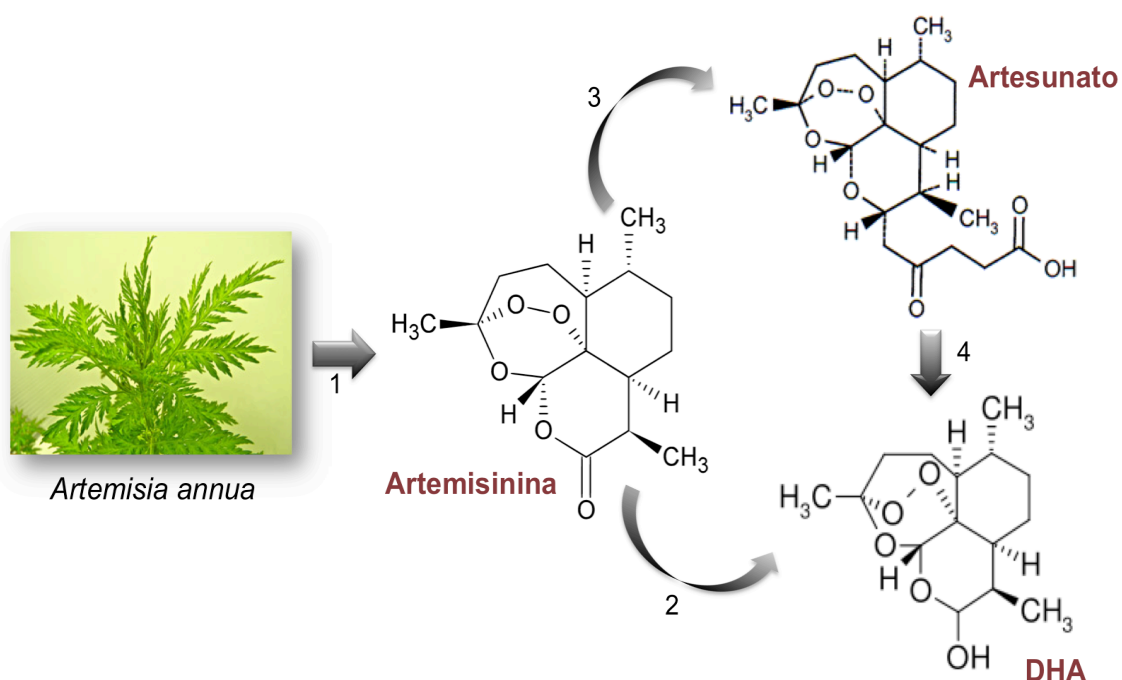


FIGURA 6: ESTRUTURA QUÍMICA DA ARTEMISININA, DHA E ARTESUNATO. 1. Artemisinina é extraída das folhas e flores da *Artemisia annua*. 2. Artemisinina é convertida em DHA pela redução da lactona. 3. Conversão da artemisinina em artesunato, seu derivado semissintético hidrossolúvel. 4. Após a administração, o artesunato é convertido em seu principal metabólito ativo, a DHA.

2.2.1 Artesunato

O artesunato, um sal hemissuccinato hidrossolúvel da artemisinina (FIGURA 6), foi desenvolvido por cientistas chineses (MESHNICK *et al.*, 1996). Muitos países adotaram a terapêutica antimalárica com artesunato sem efeitos colaterais graves ou evidências clínicas de resistência farmacológica. O artesunato em associação com a mefloquina representa um importante progresso para o tratamento da malária *falciparum* grave multirresistente (WHO, 2006a).

Dentre os vários compostos derivados da artemisinina, o artesunato talvez seja o mais versátil, porque é eficaz quando administrado por via oral, intramuscular, intravenosa ou retal. O artesunato é convertido em DHA (FIGURA 6-4), grande parte da hidrólise do artesunato em DHA é pré-sistêmica. O efeito antimalárico resulta primariamente da DHA, que é retirado do plasma com uma meia-vida de aproximadamente 45 minutos (CLARK, 2009).

2.2.2 Mecanismo de ação

Os derivados da artemisinina têm ação mais rápida sobre o parasita que os outros antimaláricos porque inibem os estágios iniciais de desenvolvimento do *Plasmodium*, logo que este invade os eritrócitos (HAYNES; KRISHNA, 2004). A maioria dos antimaláricos atua nos estágios de trofozoítos tardios e esquizontes, enquanto os derivados da artemisinina agem nos trofozoítos jovens e estágios de anel do *Plasmodium*. Devido a sua ação sobre a forma de anel, essas drogas impedem o desenvolvimento do estágio sexual inicial (gametócitos), resultando em redução da transmissão da malária em áreas endêmicas (VAN AGTMAEL *et al.*, 1999). Entretanto, os derivados da artemisinina não atuam nos estágios hepáticos do parasita, tendo pouco valor profilático, e aumentando a chance de recrudescência com o uso em monoterapia (KRISHNA; UHLEMANN; HAYNES, 2004).

Tentativas para elucidar o mecanismo da ação antimalárica deste grupo de medicamentos começaram na década de 70, passados mais de 40 anos, um enorme número de artigos foi publicado. O progresso realizado é grande, mas o mecanismo exato de ação dessas drogas ainda é controverso (UHLEMANN *et al.*, 2005).

Durante a fase sanguínea do parasita, aproximadamente 70% da hemoglobina do eritrócito infectado é digerida e o heme é liberado. O grupamento heme livre é tóxico para o parasita, que realiza sua polimerização em hemazóina. O heme ou o Fe^{+2} catalisa a abertura da ponte peróxido da artemisinina, formando radicais livres tóxicos para o parasita (VAN AGTMAEL *et al.*, 1999). Radicais carbono são a chave inicial para uma cascata de reações químicas que transforma os trioxanos em um ou mais intermediários que levam à morte do parasita da malária (POSNER *et al.*, 2004).

Os intermediários da artemisinina formados a partir da abertura da ponte peróxido não agem como radicais livres típicos, que são espécies altamente reativas, reagindo com proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Os intermediários formados possuem toxicidade seletiva contra o parasita, com isso os derivados da artemisinina são drogas pouco tóxicas ao hospedeiro em doses terapêuticas, o motivo da seletividade e baixa toxicidade da artemisinina ainda não estão completamente elucidados (MESHNICK, 2002).

Mais recentemente um mecanismo de ação alternativo para os derivados da artemisinina foi sugerido. Os derivados da artemisinina inibem a Ca^{+2} ATPase reticulosarcoendoplasmática (SERCA) do *Plasmodium falciparum*, com grande especificidade. A relação com *Plasmodium* spp. ainda está indefinida (UHLEMANN *et al.*, 2005).

2.2.3 Toxicidade reprodutiva

Estudos sobre a toxicidade reprodutiva da artemisinina e derivados são contraditórios. Apesar de várias alterações encontradas em animais, em humanos ainda não existem evidências de teratogenicidade, mas os estudos são poucos (WHO, 2006a).

2.2.3.1 Estudos em humanos:

Um estudo avaliou seis mulheres grávidas expostas à artemisinina e artemeter na China. Foram examinadas as crianças destas mulheres do nascimento até 5 a 10 anos de idade e não foram relatados efeitos adversos na mãe ou nas crianças (WANG, 1989).

MCGREADY *et al.* publicaram três artigos entre 1992 e 2001 sobre a utilização de derivados da artemisinina na gestação de 461 mulheres, sendo constatado que houve 11% de abortos nos grupos avaliados (MCGREADY *et al.*, 1998; MCGREADY *et al.*, 2001; MCGREADY; NOSTEN, 1999).

Durante uma campanha de administração de artesunato em massa em Gambia, em 1999, 287 mulheres grávidas foram expostas acidentalmente, incluindo 77 no primeiro trimestre de gestação. Como resultado desta exposição foram reportados uma hérnia umbilical, uma criptorquidia e oito neonatos mortos (DEEN *et al.*, 2001).

Dois estudos foram publicados por um grupo de pesquisadores sobre a utilização de ACTs no Sudão. No total foram avaliadas 40 mulheres grávidas sintomáticas para malária, expostas ao artemeter ou artesunato. Em ambos os estudos as mulheres foram acompanhadas durante a gestação e as crianças do nascimento até um ano de idade. Foram relatadas duas mortes de neonatos (ADAM; ALI; ABDALLA, 2006; ADAM *et al.*, 2004).

A exposição accidental a DHA foi avaliada em uma mulher na décima primeira semana de gestação e outra na décima oitava. Não foram relatados efeitos adversos (ASHLEY *et al.*, 2004; ASHLEY *et al.*, 2005).

Em Uganda, quatro mulheres grávidas foram expostas acidentalmente a artemeter no primeiro trimestre de gestação. Não foram relatados efeitos adversos (PIOLA *et al.*, 2005).

Kalilani *et al.* (2007) investigaram a segurança do artesunato associado à pirimetamina-sulfadoxina no tratamento de 47 mulheres grávidas com malária na Malásia. O tratamento foi considerado seguro e os efeitos adversos foram atribuídos à malária ou anemia materna (KALILANI *et al.*, 2007).

Dellicour *et al.* (2007) avaliaram as evidências publicadas sobre todos os derivados da artemisinina em mulheres grávidas e concluíram que apesar de nenhum dos estudos indicarem toxicidade reprodutiva dos derivados da artemisinina, também nenhum estudo foi capaz de comprovar sua segurança na gestação. No total foram avaliadas 950 mulheres grávidas expostas a derivados da artemisinina: 123 no primeiro trimestre e 822 no segundo e terceiro trimestres.

Um estudo comparou efeitos do tratamento com a associação artemeter-lumefantrina ou artesunato isolado em mulheres grávidas com malária no segundo e terceiro trimestres gestacionais. Foi encontrado um percentual significativamente maior de mortalidade infantil no primeiro ano de vida no grupo que recebeu artesunato (6,7%). No entanto, os autores colocam que as mortes, assim como anormalidades congênitas, parto prematuro, baixo peso ao nascimento, aborto e natimortos, encontrados em ambos os grupos não foram relacionados com o tratamento (MCGREADY *et al.*, 2008).

Mutabingwa *et al.* (2009) avaliaram 83 mulheres grávidas expostas a associação de artesunato-amiodaquina nos dois últimos trimestres da gestação. Não foram detectados efeitos adversos graves nas mães ou nas crianças até seis meses após o parto (MUTABINGWA *et al.*, 2009).

Nenhum desses estudos demonstrou associação entre o uso de derivados da artemisinina e aumento da incidência de efeitos adversos na gestação. Os dados limitados sugerem que os derivados da artemisinina são efetivos e não causam perdas ou anormalidades quando utilizados na gestação. Por outro lado, estes estudos não são suficientes para a determinação da segurança dessa classe de medicamentos, não sendo estes adequados para avaliação de efeitos adversos

raros, mesmo no segundo e terceiro trimestres de gestação, não existindo evidências suficientes para assegurar o risco/benefício da utilização, principalmente no primeiro trimestre. O objetivo primário dos estudos publicados foi a avaliação da atividade antimalárica do medicamento e o objetivo secundário a avaliação da gestação (neonatos com baixo peso, nascimentos prematuros, perdas embrionárias e fetais, anormalidades congênitas e efeitos adversos na mãe). Outra limitação na avaliação desses estudos é a heterogenicidade das metodologias utilizadas: diferentes medicamentos e diferenças na definição dos efeitos adversos avaliados, tornando necessária uma padronização de metodologias mais rigorosa, estudos mais amplos e farmacovigilância na utilização e avaliação de derivados da artemisinina na gestação.

2.2.3.2 Estudos em animais:

Estudos de toxicologia reprodutiva foram realizados na China pelo *China Cooperative Research Group on Qinghaosu and Its Derivatives as Antimalarial*¹ (1982 citado por CLARK *et al.*, 2004; LONGO *et al.*, 2006) utilizando artemisinina em ratos. Foram observadas reabsorções embrionárias dose-dependente e hérnia umbilical.

Estudos sobre a toxicologia reprodutiva do artemeter foram realizados por Chen *et al.*² (1984 citado por CLARK *et al.*, 2004; LONGO *et al.*, 2006), em camundongos, ratos e coelhos, resultando em reabsorções embrionárias. No mesmo trabalho Chen *et al.* (1984) trataram camundongos durante diferentes períodos da prenhez, o período com maior toxicidade embrionária foi entre o dia nono ao décimo primeiro de prenhez.

Li³ (1988 citado por CLARK *et al.*, 2004; LONGO *et al.*, 2006) administrou artesunato em ratos e observou reabsorção dose-dependente.

¹ CHINA COOPERATIVE RESEARCH GROUP ON QINGHAOSU AND ITS DERIVATIVES AS

² CHEN, L. J. *et al.* Embriotoxicity and teratogenicity studies on artemether in mice, rats and rabbits. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 5, n. 2, p. 118-122, 1984.

³ LI, Z. L. *et al.* Studies on teratogenicity of sodium artesunate. **Zongyao Tong Bao** (Bull. Chin. Mater Med.), v. 13, n. 4, p. 42-44 e 63-64, 1988.

Xu e Zhang⁴ (1996 citado por CLARK *et al.*, 2004) demonstraram que a DHA induz reabsorção em camundongos. Também foram relatados abortos após administração de DHA e artesunato em hamsters.

Clark *et al.* (2004) trataram ratos e coelhos com artesunato e observaram aborto em coelhos e reabsorção embrionária em ratos e coelhos.

Estudos realizados em 2007 no Laboratório de Toxicologia Reprodutiva da UFPR com a artemisinina na gestação de ratos resultaram em perda embrionária e fetal dose dependente. Foram realizados tratamentos em dois períodos de prenhez: do dia 7 ao 13 e do dia 14 ao 20 de prenhez. Estes resultados indicam que a artemisinina pode ser tóxica quando administrada no segundo ou terceiro trimestres de gestação (BOARETO *et al.*, 2008).

Nos estudos realizados pelo *China Cooperative Research Group on Qinghaosu and Its Derivatives as Antimalarials*, em 1982, utilizando artemisinina em ratos não foi observada alteração no desenvolvimento dos ratos que sobreviveram. Da mesma maneira, nos estudos realizados por Chen *et al.* (1984) com artemeter, também não foi observada teratogenicidade. No entanto, Li (1988) relatou retardo no desenvolvimento do esqueleto e hérnia umbilical nos filhotes de ratos que sobreviveram ao tratamento com artesunato. Clark *et al.* (2004) descreveram anormalidades cardiovasculares e alterações no desenvolvimento do esqueleto em ratos e coelhos tratados com artesunato. Longo *et al.* (2006a e 2006b) observaram anormalidades anatômicas em cultura de embriões e em embriões *in vivo* tratados com DHA.

Clark *et al.* (2008a) realizaram um estudo comparativo, relacionando a toxicidade reprodutiva de diferentes derivados da artemisinina (DHA, artemeter, arteeter e artesunato) e demonstraram que todas as drogas avaliadas são tóxicas para o embrião. No mesmo estudo, o grupo também sugere que a DHA, metabólito comum dessas drogas, é o principal agente responsável pela toxicidade (CLARK *et al.*, 2008a).

A toxicologia reprodutiva, toxicocinética e efeitos hematológicos do artesunato foram avaliados em primatas (*Macaca fascicularis*) em diferentes períodos da gestação. Os resultados demonstraram que o artesunato induziu

⁴ XU, J. H., ZHANG, Y. P. [Contragestational effects of dihydroartemisinin and artesunate] (in Chinese). *Yao Hsueh Pao Acta Pharmacologica Sinica*, v. 31, p. 657-666, 1996.

embrioletalidade (50-100%) em macacos quando administrado nas doses de 12 e 30 mg/kg/dia por mais de 12 dias a partir do dia 20 de prenhez. Em períodos mais curtos, 3 e 7 dias, não foi observada embrioletalidade. Em embriões expostos 12 mg/kg/dia de artesunato foi observado encurtamento dos ossos longos e em embriões expostos a 30 mg/kg/dia de artesunato ocorreram alterações histológicas, com redução dos eritroblastos embrionários e cardiomiopatias (CLARK *et al.*, 2008b).

O mecanismo de ação da toxicidade reprodutiva dos derivados da artemisinina em animais foi estudado por Longo *et al.* (2006a), que demonstraram que a DHA afeta os eritrócitos durante a hematopoiese no saco vitelínico e que a exposição longa inibe a angiogênese, resultando em dano tecidual e efeitos na morfologia embrionária. Um possível mecanismo de ação foi proposto por White *et al.* (2006), que demonstraram que o artesunato induz a depleção de eritroblastos embrionários. A redução dos eritroblastos resulta em anemia, que induz a embrioletalidade ou dano celular, causando anormalidades cardíacas, miopatia cardíaca e atraso no desenvolvimento dos membros e cauda (WHITE *et al.*, 2006).

2.3 MEFLOQUINA

A mefloquina foi produzida pelo Programa de Pesquisa da Malária, estabelecido em 1963 pelo Walter Reed Institute for Medical Research para desenvolvimento de novos compostos promissores no combate de cepas emergentes de *Plasmodium falciparum* resistente (SCHMIDT *et al.*, 1978).

Este fármaco é um 4-quinolinometanol, quimicamente relacionado com a quinina (FIGURA 7). Dentre os vários 4-quinolinometanóis testados com base em sua semelhança estrutural com a quinina, a mefloquina apresentou grande atividade antimalárica em modelos animais e emergiu dos ensaios clínicos como segura e altamente eficaz contra as cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes aos demais medicamentos (SCHMIDT *et al.*, 1978).

A mefloquina foi utilizada pela primeira vez para tratamento da malária *falciparum* resistente à cloroquina na Tailândia, onde foi formulada com pirimetamina-sulfadoxina para retardar o desenvolvimento de parasitos resistentes. A estratégia falhou, em grande parte porque a eliminação lenta da mefloquina

estimulou a seleção de parasitas resistentes em concentrações subterapêuticas do fármaco (WHITE, 1999).

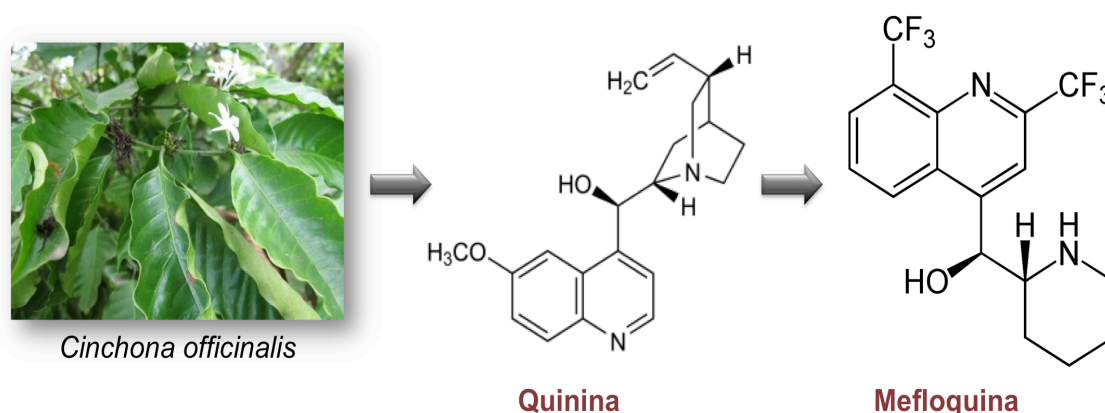


FIGURA 7: ESTRUTURA QUÍMICA DA MEFLOQUINA. A mefloquina é um 4-quinolinometanol produzido sinteticamente a partir da estrutura química do antimalárico quinina, extraído da *Cinchona ssp.*

Atualmente, a mefloquina é recomendada para uso oral na profilaxia e quimioterapia da malária *falciparum* em associação com derivados da artemisinina; essa quinolina é mais eficiente quando administrada após a carga parasitária ter sido reduzida pela administração de um derivado da artemisinina (WHO, 2006b).

A mefloquina deve ser ingerida via oral, apresentações parenterais podem provocar graves reações locais. O fármaco é bem absorvido e o processo é favorecido na presença de alimentos. A biotransformação da mefloquina não está totalmente esclarecida, mas sabe-se que o principal metabólito é o ácido mefloquina-4-carboxílico, inativo, que pode exceder os níveis plasmáticos da mefloquina (BOUDREAU *et al.*, 1990; DESJARDINS *et al.*, 1979; SIMPSON *et al.*, 1999).

A mefloquina tem alta capacidade de ligação a proteínas (98% em plasma) e sua meia vida de eliminação é longa, variando de 10 a 40 dias (média de 21 dias) em adultos, porém tendendo a ser mais curta em crianças e gestantes. Devido a meia vida de eliminação longa, o seu uso em áreas endêmicas deve ser bastante cauteloso, pois pode ocorrer reinfecção do paciente com níveis subterapêuticos de mefloquina, favorecendo o aparecimento de cepas resistentes à droga (WHO, 2011).

Em doses terapêuticas, por via oral, a mefloquina geralmente é bem tolerada, ocorrendo mais frequentemente vômitos precoces. Caso ocorram vômitos na primeira hora após a administração a dose total deve ser repetida. Os principais efeitos adversos decorrentes do uso da mefloquina são náuseas, vômitos tardios, tonturas e neurotoxicidade. A bula de comprimidos de mefloquina (Larian[®]), comercializados nos EUA, adverte que este medicamento não deve ser prescrito na profilaxia a pacientes com depressão ativa, histórico de depressão, transtorno de ansiedade generalizada, psicose, convulsões ou outros transtornos psiquiátricos (ROCHE, 2009).

Uma revisão concluiu que estudos pré-clínicos e clínicos fornecem evidências de efeitos neurotóxicos e psicoativos relacionados com o uso da mefloquina. Os efeitos adversos neurotóxicos da mefloquina parecem estar relacionados com predisposições farmacogenéticas, fatores fisiológicos e neurofisiológicos, de modo que certos indivíduos estão mais susceptíveis a tais efeitos, o que explica o fato destes efeitos não aparecerem em todos os usuários (TOOVEY, 2009).

2.3.1 Mecanismo de ação

A mefloquina consiste de uma mistura racêmica de quatro isômeros ópticos de potência antimalárica aproximadamente igual. Este antimalárico é um potente esquizonticida sanguíneo, de ação prolongada contra o *Plasmodium falciparum* resistente às 4-aminoquinolinas. Também é altamente ativa contra o *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malarie*. Não tem ação contra as fases hepáticas dos parasitos e é eficaz contra os gametócitos de *Plasmodium vivax* (SHAPIRO; GOLDBERG, 2010).

O mecanismo de ação da mefloquina não está completamente elucidado. A mefloquina comporta-se como a quinina em muitos aspectos. Os dois compostos produzem alterações morfológicas semelhantes nos estágios anelares eritrocíticos iniciais de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* (SCHMIDT *et al.*, 1978). A mefloquina provoca aumento dos vacúolos alimentares dos parasitos no *Plasmodium falciparum*, baixas concentrações extracelulares de mefloquina aumentam o pH intravacuolar dos plasmódios em excesso pela distribuição passiva de uma base fraca. A mefloquina pode agir tanto pela inibição da polimerização do

heme como pela formação de complexos tóxicos com heme livre que lesam membranas e interagem com outros componentes dos plasmódios (PALMER *et al.*, 1993; SULLIVAN *et al.*, 1998).

2.3.2 Toxidade reprodutiva

Os riscos sobre o uso da mefloquina durante a gestação não foram completamente avaliados, assim como de outros antimaláricos. Encontram-se descritos na literatura poucos estudos sobre o uso em humanos ou em animais durante o período gestacional, principalmente no primeiro trimestre. Embora a maioria dos estudos aponte para a segurança e poucos efeitos adversos para a mãe ou para o feto, o uso de mefloquina está associado a um pequeno aumento na incidência de natimortos. Os resultados publicados até o momento não são suficientes para garantir o risco benefício da mefloquina como profilaxia antimalárica, e estudos mais aprofundados sobre a sua toxicologia reprodutiva são necessários (NOSTEN *et al.*, 2006; WARD *et al.*, 2007).

2.3.2.1 Estudos em humanos:

Estudos conduzido por Nosten *et al.* (1994) demonstraram que o uso da mefloquina em grávidas com mais de 20 semanas de gestação na profilaxia da malária foi eficaz, bem tolerado e sem efeitos adversos durante a gestação na mãe ou nas crianças que foram acompanhadas por até 2 anos.

Steketee *et al.* (1996) avaliaram o uso da mefloquina e da cloroquina em mulheres nos dois últimos trimestres gestacionais e encontraram perdas fetais semelhantes entre os dois grupos.

Smoak *et al.* (1997) relataram uma alta taxa de abortos em mulheres do exército americano que utilizaram a mefloquina como profilaxia antes de estarem cientes de sua gravidez. As crianças que sobreviveram até o final da gestação nasceram saudáveis e sem malformações congênitas. Algumas crianças foram avaliadas um ano após o nascimento e não apresentaram retardo no desenvolvimento cognitivo ou motor.

O potencial teratogênico da mefloquina foi avaliado através de relatos de mulheres expostas antes ou durante a gestação enviados a indústria fabricante de

uma preparação comercial deste antimalárico. Foram avaliados aproximadamente 1.600 relatos de mulheres oriundas de vários países, a maioria dos relatos foi enviada por profissionais de saúde e referentes ao uso como profilaxia. Encontrou-se uma taxa de prevalência de malformações congênitas de 4%, no entanto não houve um padrão de malformação e esta taxa não é superior à encontrada na população em geral (VANHAUWERE; MARADIT; KERR, 1998).

Um estudo avaliou grávidas que foram tratadas com mefloquina, cloroquina, quinina ou associações com mefloquina (todas reunidas em um mesmo grupo) e comparou os efeitos adversos encontrados com mulheres tratadas somente com quinina, com outros antimaláricos exceto mefloquina ou não expostas a malária nem antimaláricos durante a gestação. Os autores encontraram uma maior taxa de natimortos no grupo que foi exposto a mefloquina, quinina, ou associações com mefloquina (4,5% das 200 gestantes). Dos 9 natimortos encontrados nas mulheres deste grupo, 5 receberam apenas mefloquina. A mefloquina não foi associada a outros fatores avaliados, como abortos, baixo peso ao nascimento, retardo neurológico ou malformações congênitas (NOSTEN *et al.*, 1999).

McGready *et al.* (2000) conduziram uma comparação aberta randomizada entre a quinina (10 mg/kg cada 8 h) por 7 dias e a associação artesunato 4 mg/kg mais mefloquina 25 mg/kg por 3 dias em mulheres com malária *falciparum* aguda no segundo e terceiro trimestres de gestação. A associação artesunato/mefloquina foi significativamente melhor tolerada, no entanto, os autores sugerem que essa vantagem deve ser melhor avaliada devido ao possível aumento no risco de natimortos com o uso de mefloquina na gestação.

2.3.2.2 Estudos em animais:

Em doses muito altas, a mefloquina causa teratogênese e anormalidades no desenvolvimento de roedores, mas em doses terapêuticas, pode ser administrada com segurança durante o segundo e o terceiro trimestres de gestação (SCHLAGENHAUF, 1999). Estudos citados por Palmer *et al.* (1993) e Phillips-Howard (1996) demonstraram que a mefloquina é teratogênica em animais em doses 5 a 20 vezes a dose recomendada para humanos. As anomalias observadas foram crânio abaulado e hidrocefalia em ratos e fenda palatina e anomalias esquelética em camundongos.

Estudos pré-clínicos com ratos e camundongos demonstraram anormalidades esqueléticas e em tecidos moles em doses superiores a 100 mg/kg (VANHAUWERE *et al.*, 1998). Também foram encontrados efeitos embriotóxicos e teratogênicos em coelhos em altas doses, 160 mg/kg (ROCHE, 2009).

2.3.3 Utilização como profilaxia antimalárica em gestantes e mulheres em idade fértil

De acordo com a *World Tourism Organization* (2012), 80 a 90 milhões de pessoas visitam áreas endêmicas de malária anualmente e, destas, um número significativo são mulheres em idade fértil (SCHLAGENHAUF *et al.*, 2012). A malária durante a gestação acarreta um grande risco para a mãe e o bebê (ROGERSON, 2010), sendo necessária sua prevenção sempre que possível. Mulheres grávidas que possuem baixa ou nenhuma imunidade contra a malária, como turistas advindas de áreas não endêmicas, estão particularmente propensas a episódios de malária severa, podendo ocorrer aborto espontâneo ou morte materna (LINDSAY *et al.*, 2000).

Turistas que viajam a áreas de alto risco de malária *falciparum* resistente à cloroquina necessitam de medidas profiláticas contra a malária, incluindo a quimioprofilaxia (SCHLAGENHAUF *et al.*, 2012). O uso de cloroquina é considerado seguro durante a gestação (WOLFE; CORDERO, 1985), no entanto, devido aos casos de resistência, sua aplicabilidade está limitada. Por razões éticas e logísticas, há uma falta de dados sobre o uso de antimaláricos durante a gestação (SCHLAGENHAUF *et al.*, 2012).

A mefloquina vem sendo avaliada em viajantes desde 1985 e é recomendada para mulheres em idade fértil que viajam a áreas resistência à cloroquina. No entanto, recomenda-se a utilização de contracepção oral por três meses após o fim do tratamento. O caso de administração inadvertida de mefloquina em mulheres grávidas não é visto como razão para finalização da gestação. Inclusive, a mefloquina é, atualmente, a única opção para profilaxia em mulheres grávidas que viajam para áreas endêmicas de malária *falciparum* resistente à cloroquina, apesar dos dados sobre a sua segurança durante a gestação serem limitados e sugerirem aumento na incidência de natimortos (SCHLAGENHAUF *et al.*, 2010).

2.4 ASSOCIAÇÃO ARTESUNATO/MEFLOQUINA

As vantagens da associação terapêutica à base de derivados da artemisinina (ACTs) estão relacionadas com as propriedades únicas e modo de ação do componente artemisinina (WHO, 2006a):

- redução importante e acelerada da biomassa do parasito; desaparecimento rápido dos sintomas clínicos;
- ação eficaz contra a resistência multimedamentosa do *Plasmodium falciparum*; redução da transmissão de gametócitos, o que pode reduzir a transmissão e cepas resistentes;
- poucas reações adversas assinalando, contudo, que os dados sobre a toxicologia dos derivados da artemisinina são limitados.

Artemisinina, artesunato, artemeter e DHA têm sido utilizados em associação com outros medicamentos antimaláricos no tratamento da malária (WHO, 2006b). Entre todos os derivados da artemisinina, o artesunato tem a informação clínica mais documentada.

Devido à meia vida muito curta dos derivados da artemisinina, a sua utilização como monoterapia exige um regime de dose múltipla durante sete dias. A associação de um destes medicamentos com outro antimalárico associado de vida média mais longa permite uma redução na duração do tratamento para três dias, e ao mesmo tempo, reforça a eficácia e reduz a probabilidade de desenvolvimento de resistência ao medicamento associado (WHO, 2006b).

A administração conjunta de artesunato com mefloquina tornou-se tratamento de primeira linha em diversos países e tem mostrado retardar o desenvolvimento de resistência à mefloquina. A estratégia terapêutica é administrar uma série do artesunato para reduzir rapidamente a quantidade de parasitos, seguida de uma ou duas doses de mefloquina para erradicar a infecção (PRICE *et al.*, 1999; WHITE, 1999).

O esquema terapêutico desta associação recomendado pela OMS é 4 mg/kg de artesunato, uma vez ao dia, por 3 dias associado à 25 mg/kg de mefloquina (15 mg/kg no segundo dia e 10 mg/kg no terceiro). Um regime alternativo de 4 mg/kg de artesunato associado a 8 mg/kg de mefloquina (1:2) por três dias, facilita a

associação de mefloquina e artesunato com a produção de um medicamento associado com dose fixa (WHO, 2010).

As reações adversas notificadas e relacionadas com o uso de mefloquina incluíam efeitos neuropsiquiátricos graves, em alguns casos de efeitos cardiotoxicos e vômitos em crianças pequenas. Também foi demonstrado que o uso de grande dose de mefloquina em associação com o artesunato resulta em menos reações adversas do que o uso da mefloquina isolada (WHO, 2010).

A principal preocupação sobre segurança das ACTs é a possibilidade de interações aditivas ou antagônicas entre os componentes. Essas interações podem ocorrer em nível de toxicocinética ou toxicodinâmica.

Poucos estudos avaliaram a farmacocinética de antimaláricos durante o período gestacional. Até o momento, somente quatro estudos foram publicados analisando a farmacocinética dos derivados da artemisinina durante a gestação, e os resultados indicam uma redução dos níveis plasmáticos de DHA, metabólito ativo desses derivados, quando comparado com mulheres não gestantes (MCGREADY *et al.*, 2006a; MCGREADY *et al.*, 2006b; MORRIS *et al.*, 2011; ONYAMBOKO *et al.*, 2011). A artemisinina e seus derivados são indutores enzimáticos das enzimas do citocromo P450 CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4 e do gene MDR1 (BURK *et al.*, 2005) em pacientes não grávidas, sendo esse um fator adicional a ser avaliado durante a gestação, onde há alteração nas enzimas de metabolismo, tanto no fígado quanto na placenta. Por outro lado, o alvo da toxicologia reprodutiva dos derivados da artemisinina são os eritroblastos embrionários (LONGO *et al.*, 2006a; LONGO *et al.*, 2006b; WHITE, *et al.*, 2006), que são muito mais sensíveis que os eritroblastos adultos (CLARK, 2009) e a interação entre essas drogas pode ocorrer no mecanismo da ação toxicológica.

É essencial estabelecer o perfil toxicológico em estudos com animais antes de avaliar a segurança na população humana em geral. O perfil da segurança é especialmente exigido para grupos de risco especiais, tais como mulheres grávidas, crianças com menos de 5 anos, mulheres que amamentam e pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquiridas (SIDA) (WHO, 2006a).

3. HIPÓTESES E PREDIÇÕES

Nós propomos que, ao associarmos a mefloquina ao tratamento com o antimalárico artesunato, possa haver uma interação sobre os efeitos embriotóxicos do artesunato. Da mesma maneira propomos que a adição de artesunato possa alterar os efeitos da mefloquina sobre a toxicidade materna e aumento na incidência de natimortos. Se essa hipótese for verdadeira, esperamos encontrar diferenças significativas entre os embriões expostos aos antimaláricos artesunato e mefloquina isolados em relação aos expostos à sua associação, nos resultados das análises teratológicas e histopatológicas nos fetos e embriões, e também nos parâmetros de toxicidade materna e letalidade embrionária e fetal.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem por objetivo investigar a toxicidade pré-clínica do artesunato e da mefloquina isolados e da associação artesunato/mefloquina em ratas Wistar prenhas e suas progênes, expostas ao tratamento durante os dias 9 a 11 de prenhez.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade materna da administração de artesunato e mefloquina isolados e da associação artesunato/mefloquina.
- Investigar possíveis alterações hormonais causadas nas progenitoras pela administração de artesunato e mefloquina isolados e da associação artesunato/mefloquina.
- Avaliar o efeito da administração de artesunato e mefloquina isolados e da associação artesunato/mefloquina sobre os embriões no período da organogênese, através de estudos de histopatologia embrionária no dia 12 de gestação.
- Investigar os efeitos teratológicos da exposição *in utero* de fetos no dia 20 de gestação ao artesunato e à mefloquina isolados e à sua associação.
- Observar a possível ocorrência de sinergismo ou antagonismo sobre os efeitos tóxicos do artesunato e da mefloquina isolados após a sua associação.

5 MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

5.1 ESCOLHA DOS MEDICAMENTOS E DOSES

Os medicamentos investigados neste estudo foram o artesunato (Knoll/Abbot, lote 2.05) e o cloridrato de mefloquina (Sifavitor, lote 8700/13/09). Ambos os medicamentos foram gentilmente cedidos pela FIOGRUZ/Farmanguinhos, PDTIS (Programa para Desenvolvimento Tecnológico de Insumos para Saúde).

O artesunato foi o derivado da artemisinina escolhido para o estudo por: (1) ser adotado pelo Ministério da Saúde (2006) para o tratamento da malária por *Plasmodium falciparum* no Brasil; (2) por ser o derivado da artemisinina mais versátil (eficaz quando administrado por via oral, intramuscular, intravenosa ou retal); e (3) que, com exceção da artemisinina, todos os medicamentos deste grupo de antimaláricos são metabolizados na mesma forma ativa, a DHA, podendo então ser um protótipo para a ação do grupo.

A associação artesunato/mefloquina representa um importante progresso para o tratamento da malária falciparum grave multirresistente, e foi escolhida por ser utilizada em diversos países como primeira linha no tratamento da malária, inclusive no Brasil. A OMS (2010) considera uma das melhores opções entre os ACTs para a América do Sul.

A dose terapêutica recomendada pela OMS (2010) para **terapêutica antimalárica em humanos** é de 4 mg/kg de artesunato e 8 mg/kg de mefloquina por três dias consecutivos.

Como primeira dose escolhida para ser estudada nesse projeto, utilizamos a **dose alométrica** para ratos a partir da dose recomendada para seres humanos, conforme fórmula apresentada a seguir:

$$\frac{\text{Dose total para o modelo} \times \text{Peso metabólico do animal modelo (PMAA)}}{\text{Peso metabólico do modelo (PMM)}}$$

Para proceder a conversão de massa (kg) em peso metabólico (kcal), elevou-se a massa do animal à potência 0,75 (NEVILL, 1994). Considerando o

modelo para seres humanos um homem de 70 kg e média de peso para a fêmea de rato gestante de 250 g, obtém-se o seguinte resultado:

Artesunato (4 mg/kg – paciente de 70 kg = 280 mg/dia):

$$\frac{280 \times 0,25^{0,75}}{70^{0,75}} = \frac{280 \times 0,35}{24,9} = 3,94 \text{ mg totais para o animal-alvo}$$

Considerando o peso médio do animal-alvo de 250 g, a dose foi de 15 mg/kg de artesunato.

Mefloquina (8 mg/kg – paciente de 70 kg = 560 mg/dia):

$$\frac{560 \times 0,25^{0,75}}{70^{0,75}} = \frac{560 \times 0,35}{24,9} = 7,87 \text{ mg totais para o animal-alvo}$$

Considerando o peso médio do animal-alvo de 250 g, a dose foi de 30 mg/kg de mefloquina.

A **segunda dose** utilizada foi calculada através da aplicação do **fator de segurança interespécies** sobre a dose terapêutica – **dose terapêutica x 10**, assim a segunda dose foi de 40 mg/kg para o artesunato e de 80 mg/kg para a mefloquina.

A medicação foi aplicada por gavagem, uma única vez ao dia, durante 3 dias, em um volume de 5 mL/kg. Para cada estudo foram utilizados grupos controle, que receberam apenas veículo.

Em cada experimento as fêmeas prenhas obtidas durante os acasalamentos foram separadas randomicamente em sete grupos.

Grupo 1: Controle veículo

Grupo 2: Artesunato 15 mg/kg

Grupo 3: Artesunato 40 mg/kg

Grupo 4: Mefloquina 30 mg/kg

Grupo 5: Mefloquina 80 mg/kg

Grupo 6: Artesunato 15 mg/kg + mefloquina 30 mg/kg

Grupo 7: Artesunato 40 mg/kg + mefloquina 80 mg/kg

5.5 CÁLCULO DOS ÍNDICES HISTOPATOLÓGICOS

Os resultados histopatológicos foram expressos como a prevalência das alterações histopatológicas em cada embrião, calculada através de uma adaptação de Bernet, *et al.* (1999). Para cada embrião avaliado, as alterações histopatológicas foram classificadas em três padrões, que incluem diversas alterações cada. Esses padrões são:

1. alterações nas células vermelhas: incluindo vasos vazios ou redução generalizada na concentração de eritroblastos primitivos; anomalias na forma e coloração dos eritroblastos;
2. morte celular: com áreas de morte celular generalizada e/ou morte celular em locais/órgãos específicos;
3. alterações estruturais e arquitetônicas de órgãos específicos: alterações na estrutura tecidual, bem com na forma e arranjo celular.

Para cada uma das alterações observadas de cada padrão foi atribuído o valor 1, e calculado um escore da alteração, conforme equação abaixo:

$$S_{alt} = \left(\frac{n_a}{n_e} \right) \times 10,$$

onde,

S_{alt} = escore da alteração;

n_a = número de vezes em que uma alteração específica foi observada;

n_e = número de embriões avaliados.

Este escore representa a quantidade de embriões com uma alteração em particular em uma escala de 0 a 10, onde: 0 = nenhum embrião com a alteração e 10 = todos os embriões com a alteração.

Para cada padrão de alteração foi calculado um índice. Este índice representa o grau de dano do padrão em cada grupo analisado. O índice é calculado pela soma dos escores de todas as alterações encontradas dentro desse padrão, dividida pelo número de alterações avaliadas.

O primeiro índice avaliado, I_{RBC} (índice de alterações de células vermelhas) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$I_{RBC} = \frac{\sum_{RBC} a}{n_{RBC}},$$

onde,

$\sum_{RBC} a$ = soma de todos os escores das alterações nas células vermelhas,

n_{RBC} = número de parâmetros avaliados para alterações nas células vermelhas.

O índice de morte celular (I_{CD}) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$I_{CD} = \frac{\sum_{CD} a}{n_{CD}},$$

onde,

$\sum_{CD} a$ = soma de todos os escores das alterações de morte celular,

n_{CD} = número de parâmetros avaliados para morte celular.

O índice de estrutura irregular dos órgãos (I_{IA}) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$I_{IA} = \frac{\sum_{IA} a}{n_{IA}},$$

onde,

$\sum_{IA} a$ = soma de todos os escores das alterações na estrutura dos órgãos,

n_{IA} = número de parâmetros avaliados para estrutura irregular dos órgãos.

O índice histopatológico geral (I_H) representa todas as lesões histológicas observadas em todos os embriões avaliados de cada grupo experimental. É a soma dos índices de cada padrão de determinado grupo experimental. A utilização deste índice permite a comparação das alterações encontradas entre diferentes grupos experimentais. O I_H foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$I_H = I_{RBC} + I_{CD} + I_{IA}$$

5.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Todo o material, a metodologia e as técnicas empregados, bem como os resultados e a discussão específica de cada um dos dois estudos que compõem esta tese estão descritos nos manuscritos apresentados a seguir (artigo 1 e 2). Todos os estudos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA 0308/08). Os procedimentos também foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as exigências estabelecidas no *Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*.

Para melhor visualização dos resultados das análises teratológicas e histopatológicas relatadas nos artigos, no final de cada artigo foi incluído o respectivo material complementar, com tabelas e figuras que não foram apresentadas nos artigos.

5.4 ARTIGO 1:

Artigo científico publicado na revista *Reproductive Toxicology*.

Reproductive Toxicology 34 (2012) 658–664



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Reproductive Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/reprotox



Study on the developmental toxicity of combined artesunate and mefloquine antimalarial drugs on rats

Ana Cláudia Boareto^{a,*}, Juliane Centeno Müller^a, Samanta Luiza de Araujo^a,
Ana Carolina Lourenço^a, Emerson Luiz Botelho Lourenço^a, Caroline Gomes^a, Bruna Minatovicz^a,
Natália Lombardi^a, Francisco Roma Paumgarten^b, Paulo Roberto Dalsenter^a

^a Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, P.O. Box 19031, CEP 81531-990 Curitiba, PR, Brazil

^b Laboratory of Environmental Toxicology, National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**Study on the developmental toxicity of combined artesunate and mefloquine
antimalarial drugs on rats**

Ana Cláudia Boareto ^a, Juliane Centeno Muller ^a, Samanta Luiza de Araujo ^a, Ana
Carolina Lourenço ^a, Emerson Botelho Lourenço ^a, Caroline Gomes ^a, Bruna
Minatovicz ^a, Natália Lombardi ^a, Francisco Roma Paumgartten ^b, Paulo Roberto
Dalsenter ^a

^a Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, P.O. Box 19031, CEP
81531-990 Curitiba, PR, Brazil.

^b Laboratory of Environmental Toxicology, National School of Public Health,
Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, 21040-900, Brazil.

*Corresponding author:

E-mail address: boaretoana@gmail.com (Ana Cláudia Boareto)

Phone: 55(41)3361-1716

Department of Pharmacology, Federal University of Parana

PO Box 19031, 81531-990 Curitiba/PR, Brazil

Abstract

Antimalarial drug combinations containing artemisinins (ACTs) have become first choice therapies for *P. falciparum* malaria. Data on safety of ACTs in pregnancy are limited and no previous study has been conducted on the developmental toxicity of artesunate-mefloquine combinations on the first trimester of gestation. To evaluate the developmental toxicity of an artesunate/mefloquine combination, pregnant rats were treated orally with artesunate (15 and 40 mg/kg bwt/day), mefloquine (30 and 80 mg/kg bwt /day) and artesunate/mefloquine (15/30 and 40/80 mg/kg bwt /day) on gestation days 9-11. Dams were C-sectioned on day 20, and their uteri and fetuses removed and examined for soft tissue and skeleton abnormalities. Artesunate increased embryoletality and the incidence of limb long bone malformations on the absence of overt maternal toxicity. Mefloquine (80 mg/kg bwt /day) was maternally toxic and enhanced fetal variations. Combination of artesunate and mefloquine did not enhance their toxicity compared to the toxicity observed after its separate administration. Embryotoxicity of artesunate was apparently attenuated when it is co-administered with mefloquine.

Keywords: Artesunate; Mefloquine; Antimalarial; Embryoletality; Teratology; Reproductive toxicology.

Abbreviations: ACTs: artemisinin-containing combination therapies; bwt: body weight; oc: ossification center; DHA: dihydroartemisinin; GD: gestational day; WHO: World Health Organization.

1. Introduction

Malaria is one of the most severe and potentially lethal mosquito-borne parasitic disease and an important public health problem in a number of countries from South and Central America, Africa and Asia. Parasites, particularly *Plasmodium falciparum*, have become resistant to conventional drugs and thus malaria therapy has relied more and more on the use of artemisinins and on the combination of drugs containing artemisinin derivatives (e.g., artesunate) [1]. One of the most effective antimalarial drug combination therapies is the co-administration of mefloquine and artesunate [2].

Besides affecting a number of women of childbearing age in endemic areas, malaria has proved to be particularly severe and lethal when infection occurs during pregnancy. The disease is also associated with adverse consequences for the conceptus including intrauterine death, stillbirth, preterm labor, and low birth weight [3-5]. Vertical transmission of the disease is also a risk for the baby [6]. Antimalarial drug therapy during pregnancy therefore has to be promptly initiated making safety of currently available drugs and their combination for mothers and their babies a research topic of paramount relevance.

Artesunate, dihydroartemisinin (DHA), artemether and arteether are semi-synthetic derivatives of artemisinin that, in nature, is found in the leaves and flowers of *Artemisia annua* L. These compounds belong to a class of antimalarials that are sesquiterpene lactones containing an endoperoxide bridge, which is necessary for antimalarial activity [7]. DHA is the major active metabolite common to several artemisinins including artesunate, which is the succinate ester of DHA [8]. Since artemisinins are potent and rapidly acting drugs to which there have been few

cases of resistance [9-11], they have become one of the most important groups of drugs available to treat malaria. The World Health Organization (WHO) has recommended that artemisinin-containing combination therapies (ACTs) should be used to treat *P. falciparum* in areas of drug resistance [12, 13].

Reproductive and developmental toxicity of artesunate and mefloquine were studied during drug development and afterwards. Pre-clinical studies showed that artesunate is embryolethal and increases the occurrence of soft tissue and skeleton malformations in the prenatally exposed offspring in the absence of overt maternal toxicity [14-16]. Dose-response curves for embryotoxic effects of artesunate are rather steep and embryo development period of highest sensitivity was found to be between days 10-14 of gestation in the rat [16]. It was reported that gestation day 10 is the most sensitive day for inducing teratogenic effects and day 11 the most sensitive day for causing embryo deaths [14, 17].

Mefloquine is generally well tolerated by patients but its clinical use is at times associated with central nervous system side effects such as seizures and hallucinations. It was reported that mefloquine at high doses, that far exceed human therapeutic dose range (at 5–20-fold), was maternally and developmentally toxic in animal studies [18, 19]. Clinical trials on the use of mefloquine in pregnancy had reported a possible association between the use of mefloquine treatment in pregnancy and stillbirths [20].

Non-clinical and clinical studies on the safety of antimalarial drug combinations during pregnancy have seldom been performed. A major concern regarding safety of ACTs in pregnancy is the possibility of harmful additive or synergistic interactions between the drugs. Along this line, an exception was a study by Clark et al (2004) [14] on the developmental toxicity of a three drug combination consisting of

chlorproguanil-dapsone and artesunate (1:1.25:2) in rats and rabbits. Data from the foregoing study showed no evidence of a modifying effect (protection and potentiation) of this combination compared to artesunate given separately.

McGready and coworkers (2000) conducted an open randomized comparison of supervised quinine (10 mg/kg every 8 h) for 7 days versus artesunate 4 mg/kg plus mefloquine 25 mg/kg per day for 3 days in women with acute uncomplicated falciparum malaria in the second or third trimesters of pregnancy. The artesunate/mefloquine combination was significantly better tolerated, however the authors suggest that these advantages must be balanced against a possible increased risk of stillbirth with the use of mefloquine in pregnancy [21].

The objective of this study was to provide data on the developmental toxicity of a combination of artesunate and mefloquine on rats. As far as the authors are aware developmental toxicity of mefloquine and artesunate combinations has not been investigated so far.

2 Materials and Methods

2.1 Animals

All Wistar rats used in this study were from the Federal University of Parana animal house breeding stock. Animals were maintained under controlled environmental conditions at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and a constant 12 h light/12 h dark cycle. Standard pellet food (Nuvital, Curitiba/PR, Brazil) and tap water were available *ad libitum*. The study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of Federal University of Parana (Protocol number: 308/08). Female rats were placed into the male cage - at a ratio of 3:1 - for three hours at the

end of the dark period. Mating was confirmed by the presence of sperm in vaginal smears and the day on which sperm was detected was considered gestation day 0 (GD 0). Pregnant females were randomly assigned to control and treatment groups. Maternal weight was monitored daily during gestation and all animals were observed for clinical signs of toxicity.

2.2 Drugs and treatment

Artesunate (artesunic acid; Knoll/Abbot, Lot No. 2.05) and mefloquine (mefloquine chloridrate; Sifavitor, Lot No. 8700/13/09) were supplied by FIOCRUZ/PDTIS (Rio de Janeiro, Brazil). Suspension of artesunate 1% carboxymethyl cellulose and suspension of mefloquine in distilled water were prepared daily.

Experimental groups were as follows: (I) vehicle control; (II) artesunate 15 mg/kg bwt /day; (III) artesunate 40 mg/kg bwt/day; (IV) mefloquine 30 mg/kg bwt/day; (V) mefloquine 80 mg/kg bwt/day; (VI) artesunate 15 mg/kg bwt/day plus mefloquine 30 mg/kg bwt/day; (VII) artesunate 40 mg/kg bwt/day plus mefloquine 80 mg/kg bwt/day. The doses of artesunate and mefloquine recommended by WHO (2010) for treatment during 3 consecutive days were artesunate 4 mg/kg and mefloquine 8 mg/kg (1:2) [22]. In the present study, the doses of artesunate were chosen taking into consideration the human therapeutic dose (4 mg/kg). The lower dose of artesunate (15 mg/kg bwt/day) is the extrapolation of the human therapeutic dose to rat dose estimated by allometry ($4 \times 3,94 = 15,76$ mg/kg) [23]. The selected high dose was 10-fold the human therapeutic dose. The mefloquine dose was based on the proportion of artesunate and mefloquine recommended by WHO (2010) [22].

All drugs were administered by gavage once a day from day 9 to 11 of gestation. The 3-day treatment regimen is consistent with a WHO (2010) recommendation for treatment of human malaria with artemisinin-containing combinations of drugs [22]. The volume administered was 5 mL/kg, based on the animal body weight on the day of dosing.

2.3 Cesarean section and fetal examination

Pregnant female were euthanized by decapitation and were submitted to cesarean section on GD 20. Gravid uteri were removed and weighed. Implantation sites, resorptions, and live and dead fetuses were counted. Live fetuses were weighed individually and examined for externally visible abnormalities. Terms used for describing fetal observations were those listed in the most recent update of the Terminology of Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 2)" [24].

2.4 Evaluation of visceral abnormalities

One third of fetuses from each litter was selected at random for visceral analysis and fixed in Bodian solution (148 mL of distilled water, 50 mL of formaldehyde, 50 mL of acetic acid, 752 mL of ethyl alcohol). Abdominal and thoracic viscera were examined using Staples's technique of dissection [25]. Selected fixed organs were removed and weighed, including lung, heart, liver, kidneys and thymus. Organ weights were evaluated as absolute and relative weights $[(\text{organ weight}/\text{body weight}) \times 100]$. Fetal sex determined by the anogenital distance was further confirmed by visceral examination. Head abnormalities were examined by performing serial cuts as suggested by Wilson (1965) [26].

2.5 Evaluation of skeletal abnormalities

The remaining fetuses from each litter were examined for skeletal abnormalities. Fetuses were fixed for a week in a buffered formaldehyde solution and subsequently cleared and stained with Alizarin red S, essentially as described by Staples and Schnell (1964) [27].

2.6 Statistical analysis

Maternal weight, maternal weight gain, gravid uterus weight, resorption of the whole litter, implantations per litter, live fetuses per litter, percent postimplantation losses per litter, litters with live fetuses and fetal body weight were first tested for normal distribution by the D'Agostinho & Pearson normality test. Data not fitting a normal distribution were analyzed by the non parametric test Kruskal-Wallis, followed by the Dunn's Multiple Comparison Test. Parametric data were analyzed by ANOVA, followed by the Tukey's Multiple Comparison Test, and expressed as mean \pm S.E.M. To evaluate the fetuses external, visceral and skeletal abnormalities was calculated the mean percent of fetuses per litter of each observation, and analyzed using a mean t -test by the non parametric test Kruskal-Wallis, followed by the Dunn's Multiple Comparison Test. In any case, a difference was considered to be statistically significant when $p < 0.05$. Analysis and graphs were performed using Graphpad Prism[®] version 5.0.

3 Results

3.1 Maternal toxicity and pregnancy weight gain

No deaths or other clinical signs of overt toxicity were noted among dams treated with either anti-malarial drug alone or with combined therapy schemes on GD 9-11.

3.1.1 Artesunate (15 mg/kg bwt/day)

The dams weight gain during gestation of the group treated with artesunate (15 mg/kg bwt/day) was normal when compared to control group, furthermore pregnancy weight gain after deduction of gravid uterus weight was not reduced (Table 1).

3.1.2 Artesunate (40 mg/kg bwt /day)

The artesunate (40 mg/kg bwt/day) markedly reduced dam's body weight on GD 20 and whole pregnancy weight gains. Gravid uterus weight was also markedly decreased, whole gestation weight gain deficits reflect embryotoxic (embryo lethality) rather than maternal toxic effects. Overall, pregnancy weight gain after deduction of gravid uterus weight was not reduced in this group as compared to control group (Table 1).

3.1.3. Mefloquine (30 mg/kg bwt/day)

In the group treated with mefloquine (30 mg/kg bwt/day), the dams weight gain during gestation was similar to control group, furthermore pregnancy weight gain after deduction of gravid uterus weight was not reduced (Table 1).

3.1.4 Mefloquine (80 mg/kg bwt/day)

Dams treated with the highest dose of mefloquine (80 mg/kg bwt/ day) showed a lower pregnancy body weight gain during the treatment period and shortly thereafter (GD 9-12) (Table 1). Mefloquine-treated dams exhibited a catch up body weight gain at late pregnancy (GD 15-20) so that their whole gestation weight gain (GD 0-20) did not differ statistically from the dams from the control group. Since mefloquine did not enhance the incidence post-implantations losses (Table 2) this transient weight gain deficit indicated that the highest dose of this antimalarial drug was maternally toxic.

3.1.5 Artesunate/mefloquine (15/30 mg/kg bwt/day) combination

The treatment with artesunate (15 mg/kg bwt/day) and mefloquine (30 mg/kg bwt/day) combination did not affected the dams weight gain during gestation. Pregnancy weight gain after deduction of gravid uterus weight was not reduced (Table 1).

3.1.6 Artesunate/mefloquine (40/80 mg/kg bwt/day) combination

The treatment with artesunate/mefloquine (40/80 mg/kg bwt/day) combination, markedly reduced dam's body weights on GD 20 and whole pregnancy weight gains, in the same way that artesunate (80 mg/kg bwt/day) (Table

1). Since in both cases gravid uterus weight was also markedly decreased, whole gestation weight gain deficits reflect embryotoxic (embryo lethality) rather than maternal toxic effects. Overall, pregnancy weight gain after deduction of gravid uterus weight was not reduced in any of the treated groups as compared to controls.

3.2 Embryotoxicity: embryo survival and fetal body weight

3.2.1 Artesunate (15 mg/kg bwt/day)

At the lowest dose tested, artesunate caused whole-litter resorptions in 25% of treated dams and, in the remaining litters, it produced in average 32% of within-litter post-implantation losses. An additional indication that artesunate, at the lowest dose tested (15 mg/kg bwt/day), was embryotoxic is the reduced fetal body weight compared to control values (Table 2).

3.2.2 Artesunate (40 mg/kg bwt/day)

Artesunate was markedly embryo lethal at both dose levels. As shown in Table 2, 100% of rats treated with the highest dose of artesunate (40 mg/kg bwt/day) lost the whole litter.

3.2.3 Mefloquine (30 mg/kg bwt/day)

Mefloquine (30 mg/kg bwt/day) did not enhance embryo lethality nor did it decrease fetal body weight on GD 20 when compared to control group (Table 2).

3.2.4 Mefloquine (80 mg/kg bwt/day)

Mefloquine in the highest dose (80 mg/kg bwt/day) also did not enhance embryolethality nor did it decrease fetal body weight on GD 20 (Table 2). However, one single litter in the 80 mg/kg/day mefloquine group had total litter loss.

3.2.5 Artesunate/mefloquine (15/30 mg/kg bwt/day) combination

Artesunate mediated embryotoxicity seemed to have been attenuated by co-treatment with mefloquine. Within-litter postimplantation losses were somewhat less marked among dams treated with artesunate-mefloquine combinations compared to the group that received equivalent doses of artesunate alone. A similar attenuation seemed to have occurred regarding the detrimental effect of artesunate (15 mg/kg bwt/day) on fetal body weight. The body weight of fetuses from groups treated with artesunate/mefloquine (15/30 mg/kg bwt/day) combination did not differ from those of the control group fetuses (Table 2).

3.2.6 Artesunate/mefloquine (40/80 mg/kg bwt/day) combination

In the group treated with the higher doses of artesunate/mefloquine combination there was also attenuation on the embryotoxicity mediated by artesunate. 100% of the rats treated with the highest dose of artesunate (40 mg/kg bwt/day) lost the whole litter, however the artesunate (40 mg/kg bwt/day) co-treatment with mefloquine (80 mg/kg bwt/day) induced approximately 20% of live fetuses. The body weight of surviving fetus did not differ from those of the control group fetuses (Table 2).

3.3 Embryotoxicity: external, visceral and skeleton abnormalities

No consistent increase in the occurrence of externally visible and visceral abnormalities over the control group incidence was produced by treatment with artesunate, mefloquine and their combination. Due to external and soft tissue (visceral) abnormalities have not been treatment-related, the findings were not listed, just the total number of fetuses affected is listed in Table 3. The occurrence of major skeletal abnormalities in control fetuses as well as in fetuses from groups treated with artesunate, mefloquine and antimalarial drug combination is also shown in Table 3.

3.3.1 Artesunate (15 mg/kg bwt/day)

No consistent increase in the occurrence of externally visible and visceral abnormalities over the control group incidence was produced by treatment artesunate (15 mg/kg bwt/day). Small yet statistically significant reductions of fetal liver (260 ± 10 vs 310 ± 10 mg, mean \pm SEM, artesunate vs control) and lung (66 ± 4 vs 89 ± 3 mg, mean \pm SEM, artesunate vs control) weights as compared to the control group were noted in the offspring of artesunate (15 mg/kg bwt /day) treated mothers. These organ weights reduction are no longer significant when it is calculated the relative organ $[(\text{organ weight/body weight}) \times 100]$. No other difference between control and artesunate (15 mg/kg bwt/day) regarding fetal organ weights (liver, kidneys, thymus, lungs and heart) was found.

A higher incidence of scapula bent as well as forelimb long bones bent, such as humerus, radius and ulna bent, structural abnormalities that are generally classified as malformations, indicated that artesunate (15 mg/kg bwt/day) was

teratogenic to rats. It should be highlighted that such malformations of scapula and long limb bones were not recorded in fetuses from the study control group. Moreover, treatment with artesunate (15 mg bwt/day) alone on GD9-11 also enhanced the incidence of misshapen ribs and produced abnormalities of thoracic and lumbar vertebra ossification (bipartite ossification center) that were not recorded in controls and any other treatment group (Table 3). Fetuses prenatally exposed to artesunate (15 mg/kg bwt/day) alone also exhibited an increased incidence of signs of deficient ossification (incomplete ossification and unossified areas) compared to the frequency found in controls and in other treatment groups, including those that received artesunate plus mefloquine (Table 3). The foregoing abnormalities of bone ossification, however, are generally regarded as being variations rather than malformations.

3.3.2 Artesunate (40 mg/kg bwt/day)

There were no live fetuses exposed to the higher artesunate dose (40 mg/kg bwt/day) (Table 2).

3.3.3 Mefloquine (30 mg/kg bwt/day)

The fetuses exposed to mefloquine (30 mg/kg bwt/day) showed no consistent increase in the occurrence of externally visible and visceral abnormalities over the control group incidence. There was also no consistent increase in the skeletal abnormalities (Table 3).

3.3.4 Mefloquine (80 mg/kg bwt/day)

No consistent increase in the occurrence of externally visible, visceral and skeletal abnormalities over the control group incidence was produced by mefloquine treatment (80 mg/kg bwt/day) (Table 3).

3.3.5 Artesunate/mefloquine (15/30 mg/kg bwt/day) combination

No consistent increase in the occurrence of externally visible and visceral abnormalities over the control group incidence was produced by artesunate/mefloquine (15/30 mg/kg bwt/day) combination treatment.

Treatment with artesunate/mefloquine (15/30 mg bwt/day) combination on GD9-11 enhanced the incidence of wavy ribs and produced abnormalities of pelvic girdle and vertebra ossification. Other teratological effects of the treatment with artesunate (15 mg/kg bwt/day) alone observed as malformations of scapula and long limb were not observed with the co-treatment with mefloquine (Table 3).

Fetuses prenatally exposed to artesunate/mefloquine (15/30 mg/kg bwt/day) combination also exhibited an increased incidence of signs of deficient ossification (incomplete ossification and unossified areas) compared to the frequency found in control group. However this deficient ossification was less intense than in the fetuses exposed to artesunate (15 mg/kg bwt/day) alone (Table 3).

3.3.5 Artesunate/mefloquine (40/80 mg/kg bwt/day) combination

There was no consistent increase in the occurrence of externally visible and visceral abnormalities over the control group incidence in the fetuses exposed to artesunate/mefloquine (40/80 mg/kg bwt/day) combination. Small yet statistically significant reductions the lung (65 ± 5 vs 89 ± 3 mg, mean \pm SEM, drug combination vs

control) but not the liver weight (300 ± 10 vs 310 ± 10 mg, mean \pm SEM, drug combination vs control) was observed in the group treated with artesunate-mefloquine combination (40/80 mg/kg bwt/day). These organ weights reduction are no longer significant when it is calculated the relative organ [(organ weight/body weight) \times 100]. No other difference between control and treated groups regarding fetal organ weights (liver, kidneys, thymus, lungs and heart) was found.

No malformations (e.g., bent bones) were noted in the relatively small number of fetuses and litters that survived to the higher dose of artesunate and mefloquine combination (40/80 mg/kg bwt /day) (Table 3).

-

4. Discussion and conclusions

Results from this study are consistent with literature data showing that artesunate impairs rat embryo development. The highest dose of artesunate (40 mg/kg bwt/day) administered on GD 9-11 caused a 100% of whole-litter deaths. The lowest dose tested (15 mg/kg bwt/day) was also markedly embryotoxic. It produced 25% of whole-litter post-implantation losses and nearly 32% of within-litter embryo deaths, reduced fetal body weight and increased the incidence of skeletal variations and malformations. It is noteworthy that both embryo-lethal and teratogenic effects of artesunate were observed at doses that were not overtly toxic to the mothers thereby suggesting that this antimalarial drug is a selective developmental toxicant. Data from a limited series of patients in the first trimester of pregnancy, did not show increases in miscarriages or stillbirths with morphological abnormalities [21, 28, 29]. The current data on the use of artemisinins in humans

did not provide sufficient evidence to effectively assess the risk-benefit profile in pregnant woman, particularly during first trimester [30].

Mefloquine, on the other side, seemed to be far less toxic to rat embryos. Although being maternally toxic at the highest dose tested (it induced a lower pregnancy weight gain on GD 9-12), mefloquine alone caused no discernible increase in embryo deaths, nor did it produce any increase in the occurrence of structural malformation in term fetuses. However, one single dam in the 80 mg/kg/day mefloquine group lost the whole litter. Clinical trials on the use of mefloquine in pregnant patients had reported a possible association between treatment with mefloquine and occurrence of stillbirths [20, 21], so this total litter loss could be related with this clinical concern. The use of the mefloquine has increased in recent years because *P. falciparum* strains that are resistant to other available drugs have become more and more frequent. Mefloquine has been widely prescribed for malaria prophylaxis in travelers and in combination with artesunate for the treatment of uncomplicated *P. falciparum* infections [13, 31]. The toxicity of mefloquine has been studied extensively [1, 18, 31, 32] results generally showed that it is relatively well tolerated. Currently, women in childbearing age are advised to take effective contraceptive measures up to three months after the last dose. The use during pregnancy is recommended only if the expected benefits clearly outweigh the potential risks for the fetus [33]. Studies on the use of mefloquine in prophylaxis during the second half of pregnancy have concluded that the drug is safe [8, 9], but there are few data on the effects on the fetus of exposures to mefloquine during early gestation [32-35]

In the present study, no significant visceral findings were observed with the treatments. The few reports of teratogenic effects of artemisinins in studies

performed before 2004 did not show soft tissue (visceral) abnormalities [8]. However, more recent studies in which artesunate was administered orally to rats, found cardiovascular malformations (ventricular septal defects and various great vessel defects) [14, 15]. In this study, heart was examined using Staple's technique of dissection [36], and the great vessels were not evaluated. However, in the teratological studies that detected cardiovascular malformations, heart was examined using Solomon and coworkers technique, which is more meticulous and sensitive for detecting these defects [37].

The embryotoxic effects induced by co-administration of mefloquine and artesunate at both dose levels (15/30 and 40/80) were somewhat different from those that would be expected from mere summation of their separate effects. When pregnant rats were treated with both drugs (artesunate/mefloquine 40/80) maternal toxicity associated with mefloquine (80 mg/kg bwt/day) was apparent, while the marked embryo-lethal effect of artesunate (40 mg/kg bwt/day) seemed to have been attenuated. All embryos of 19 litters exposed to artesunate (40 mg/kg bwt/day) alone died while conceptuses from 4 out of 18 litters exposed to both drugs (40/80 combination) survived to C-section on GD 20. Furthermore, developmental toxic effects noted after administration of artesunate (15 mg/kg bwt/day) alone, such as increased incidences of post-implantation losses and malformations and a lower fetal body weight, were also apparently attenuated when artesunate was co-administered with mefloquine (15/30 combination).

Data provided by this study therefore indicated that, as far as rats are concerned, combinations of artesunate and mefloquine do not enhance maternal and developmental toxicities observed when either drug is administered separately at the same oral doses. Actually, results strongly suggested that co-administration

of artesunate and mefloquine attenuates the embryolethal and teratogenic effects of the former antimalarial drug and does not substantially modify the adverse effects of the latter drug on mothers and their offspring.

The mode through which mefloquine attenuates the developmental toxic effects of artesunate is unclear. In principle, observed drug interactions may involve toxicokinetic, toxicodynamic or both factors.

After being absorbed, artesunate (dihydroartemisinin succinate, DHA-succinate) ester bond is hydrolyzed within minutes yielding DHA that is believed to be its main active metabolite against malaria parasites [38] and also the proximate developmental toxicant compound [8]. Some in vitro studies suggested that in humans CYP2A6 is the major metabolizing enzyme for artesunate [39]. DHA, on the other side, is converted into inactive metabolites via glucuronidation catalyzed by UDP-glucuronosyltransferases (e.g., in humans, UGT1A9, UGT2B7 and possibly also UGT1A1 and UGT1A8) [40].

A study in human male healthy volunteers showed that mefloquine when co-administered with artesunate for three consecutive days does not alter either artesunate or DHA pharmacokinetics (AUC and clearance) [41]. As far the authors are aware, no data has been provided on possible kinetic interactions of mefloquine and artesunate or DHA in pregnant women or laboratory animals. It should be borne in mind, however, that a number of clinical studies have supported the view that artesunate and mefloquine combined therapy is highly effective against plasmodium parasites in pregnant and non pregnant women and, thus, it is fair to think that co-administration of mefloquine, as recommended by WHO antimalarial drug combination regimen [22], does not reduce bioavailability of DHA in treated patients. Along this line, taking into account results from the present study, a

possibility that deserves to be further investigated is whether co-administration of mefloquine would reduce transplacental transfer of DHA from the mother to the embryonic compartment.

Whether or not mefloquine attenuates artesunate-mediated teratogenicity and embryoletality by interfering with its toxicodynamics remains to be further elucidated as well. A hypothesis has been advanced that the initial event in the developmental toxicity of artesunate and DHA is a depletion of primitive embryonic erythroblasts [17, 42, 43]. Since Clark et al (2008) [15] demonstrated that embryoletal doses of artesunate cause only minor changes in maternal reticulocyte counts (i.e. embryonic erythroblasts would be more susceptible than maternal reticulocytes), this interpretation seems to be consistent with the finding that artesunate/DHA developmental toxicity occurs in the absence of overt maternal toxicity. It is currently unclear how mefloquine would antagonize embryonic erythroblasts depletion-induced by artesunate/DHA. Effects of co-administration of mefloquine on the DHA-produced depletion of embryonic erythroblasts should be further tested. If mefloquine in fact antagonizes the effect of DHA on embryonic erythroblasts, this finding would considerably strengthen the view that depletion of embryonic erythroblasts by DHA results in embryo deaths and a set of structural malformations.

In conclusion, at dose ranges tested in this study, artesunate was a developmentally toxic and teratogenic compound and mefloquine was a maternally toxic drug with far less deleterious effects on the embryo. Combination of both antimalarial drugs, however, did not enhance either the developmental or the maternal toxicity shown by artesunate and mefloquine when administered separately. On the contrary, results presented in this paper suggested that

developmental toxicity of artesunate is somewhat attenuated when it is co-administered with mefloquine. The mode through which mefloquine reduces artesunate developmental toxicity remains unclear. Since clinical studies with male healthy volunteers showed that mefloquine does not alter artesunate / DHA kinetics, a possible explanation would be an interference of mefloquine with transplacental transfer of DHA to the embryo. Interactions at a toxicodynamic level cannot be ruled out either. Owing to malaria therapy dependence on the use of drug combinations containing artemisinins, and also to the increased morbidity and mortality of malaria in pregnant women, mechanisms by which mefloquine and artesunate interact during gestation deserve to be further investigated.

Acknowledgments

We are grateful to CAPES, CNPq and FUNPAR for financial support, and to FIOCRUZ/PDTIS for supplying the drugs.

Table 1. Maternal weight gain of rats treated orally with artesunate, mefloquine and a combination of artesunate and mefloquine on days 9-11 of gestation (GD 9-11).

Treatment	Vehicle-control	Artesunate (mg/kg bwt/day)		Mefloquine (mg/kg bwt/day)		Artesunate/Mefloquine (mg/kg bwt/day)	
		15	40	30	80	15/30	40/80
Treated females (N)	30	25	25	25	25	25	25
Pregnant females (N)	23	20	19	19	19	19	18
Pregnant / treated females (%)	76.7	80	76	76	76	76	72
Maternal weight (g)							
GD 0	253 ± 3.3	255 ± 3.8	249 ± 4.4	254 ± 3.9	253 ± 5.7	246 ± 4.5	253 ± 5.2
GD 20	353 ± 5.9	337 ± 7.5	293 ± 4.7***	357 ± 7.1	332 ± 6.3	336 ± 8.6	298 ± 10.1***
Gravid uterus weight (g)	58.1 ± 2.6	39.2 ± 5.9	4.2 ± 0.3***	56.8 ± 4.5	43 ± 3.8	48.9 ± 6.4	14.7 ± 5 ***
Maternal weight gain (Δg)							
GD 0-9	30.7 ± 1.3	33.5 ± 1.8	31.4 ± 1.6	32.2 ± 25.7	25.7 ± 2.4	29.1 ± 1.5	29.3 ± 2
GD 9-12	12.3 ± 0.9	11.2 ± 1.4	7.5 ± 1.3	12.1 ± 1	6.1 ± 1.5**	10.5 ± 0.9	0.9 ± 1.6***
GD 12-15	11 ± 1.3	7.3 ± 1.6	6.7 ± 1.4	9.2 ± 1.5	9.5 ± 1.2	6.5 ± 1.9	0.7 ± 5.2
GD 15-20	46 ± 2.3	30.3 ± 5.3	-1.4 ± 2.1***	49.1 ± 3.6	36.9 ± 2.4	43 ± 4.3	13.9 ± 8.7**
GD 0-20	99.9 ± 3.7	82.15 ± 6.6	44.2 ± 2.5***	102.6 ± 4.8	78.2 ± 3	89.1 ± 6.1	44.8 ± 11***
GD 0-20 (minus uterus weight)	41.63 ± 2.6	44.2 ± 6.9	39.9 ± 2.5	45.9 ± 2.9	35.2 ± 3.5	40.1 ± 3.2	29.8 ± 8.5

Values are means ± S.E.M. ** $p \leq 0.01$ / *** $p \leq 0.001$ ANOVA and *post hoc* Tukey's test; weight gain (Δg) was analyzed by the Kruskal-Wallis test and *post hoc* Dunn's test. bwt= body weight.

Table 2. Cesarean section (GD 20) data from rats treated orally with artesunate, mefloquine and a combination of artesunate and mefloquine on days 9-11 of gestation (GD 9-11).

Treatment	Vehicle-control	Artesunate (mg/kg bwt/day)		Mefloquine (mg/kg bwt/day)		Artesunate/Mefloquine (mg/kg bwt/day)	
		15	40	30	80	15/30	40/80
Pregnant females (N)	23	20	19	19	19	19	18
Resorption of the whole litter (N)	0	5 [*]	19 ^{***}	0	1	5 [*]	14 ^{***}
Implantations per litter ^a (N)	11.3 ± 0.4	12.7 ± 0.5	11.2 ± 0.7	10.7 ± 0.8	8.8 ± 0.8	10.5 ± 0.9	11.1 ± 0.7
Live fetuses per litter ^a (N)	10.6 ± 0.5	6.8 ± 1.2	0 ^{***}	10.2 ± 0.9	8.2 ± 0.8	8.8 ± 1.2	2.3 ± 1.1 ^{***}
% postimplantation losses per litter ^a	7.7 ± 2.7	48.2 ± 9.1 [*]	100 ^{***}	7.1 ± 4.3	10.7 ± 5.2	26.4 ± 9.4	77.8 ± 10.1 ^{***}
Litters with live fetuses	23	15 [*]	0 ^{***}	19	18	14 [*]	4 ^{***}
Implantations per litter ^b (N)	11.3 ± 0.4	12.8 ± 0.6	-	10.7 ± 0.8	8.8 ± 0.8	11.6 ± 0.6	10.3 ± 1
Live fetuses per litter ^b (N)	10.6 ± 0.5	8.9 ± 1.1	-	10.2 ± 0.9	8.7 ± 0.7	9.8 ± 1.1	10.3 ± 1
% postimplantation losses per litter ^b	7.7 ± 2.7	32.0 ± 8.5	-	7.1 ± 4.3	6.0 ± 2.4	12.6 ± 6.8	0
Fetal body weight ^c (g)	3.2 ± 0.1	2.8 ± 0.1 [*]	-	3.2 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.1

Values are means ± S.E.M. ^a All litters. ^b Excluding whole litters resorptions. ^c Means of litter means. * $p \leq 0.05$ / *** $p \leq 0.001$ Kruskal-Wallis test and *post hoc* Dunn's test; resorption of the whole litter and litters with live fetuses were analyzed by χ^2 Statistic Test. bwt= body weight.

Table 3. Occurrence of externally visible, visceral and skeletal abnormalities in the offspring of rats treated orally with artesunate, mefloquine and a combination of artesunate and mefloquine on days 9-11 of gestation (GD 9-11). (Continuation)

Bent ^(M)	0	15.4 (11/2)*	0	0	0	0
Incomplete ossification ^(V)	0	7.7 (1/1)	0	0.9 (1/1)	0	0
Forelimb bones						
Humerus, Bent ^(M)	0	29.8 (11/4)**	0	0	0	0
Radius, Bent ^(M)	0	6.4 (6/2)	0	0	0	0
Ulna, Bent ^(M)	0	19.2 (12/4)***	0	0	0	0
Ribs						
Rib, Misshapen ^(M)	0	11.5 (4/2)*	2 (2/1)	0	0	0
Rib, Wavy ^(V)	12.3 (19/11)	55.6 (36/11)**	16.3 (12/7)	18 (10/15)	57 (53/10)*	22.6 (5/3)
Rib, Lumbar (extra) ^(V)	46.9 (73/17)	67.5 (49/11)	48.6 (54/12)	39.2 (28/13)	69 (58/11)	28.8 (10/4)
Rib, Unossified area ^(V)	0	37.5 (21/5)**	0	0	8.3 (3/2)	25 (7/2)*
Vertebral column						
Unossified areas ^(V)	10.5 (16/8)	41.3 (38/13)***	4.2 (5/4)	4.3 (4/3)	14 (15/8)	21.4 (6/2)**
Incomplete ossification ^(V)	1.97 (3/2)	27.2 (25/8)***	5 (6/2)	3.2 (3/1)	3.7 (4/1)	7.1 (2/2)
Bipartite oc ^(V)	0	13 (12/4)***	5.9 (7/1)**	0	3.7 (4/1)	0
Dumbbell shaped oc ^(V)	0	2.2 (2/2)*	0	0	0	0
Pelvic girdle						
Ilium, Unossified area ^(V)	0	15.4 (10/2)*	1.9 (1/1)	0	0	16.7 (2/1)**
Ilium, Incomplete ossification ^(V)	0	11.5 (2/2)*	0	0	0	0
Ischium, Unossified area ^(V)	0	23.1 (8/3)*	9.6 (9/2)	2.1 (1/1)	13.1 (7/2)**	16.7 (4/1)*
Pubis, Unossified area ^(V)	16.8 (22/9)	24 (10/5)	19.4 (18/7)	12 (9/6)	61.5 (54/8)*	100 (28/4)**
Pubis, Incomplete ossification ^(V)	0	26.9 (6/3)*	8.4 (3/2)	0	0	0
Hindlimb bones						
Femur, Bent ^(M)	0	7.7 (1/1)	0	0	0	0
Femur, Incomplete ossification ^(V)	0	19.2 (4/3)*	0	0	0	0

Table 3. Occurrence of externally visible, visceral and skeletal abnormalities in the offspring of rats treated orally with artesunate, mefloquine and a combination of artesunate and mefloquine on days 9-11 of gestation (GD 9-11). (Continuation)

Fibula, Unossified area ^(V)	0	24.4 (5/2)*	2.9 (2/2)	0	0	4.2 (1/1)
Tibia, Unossified area ^(V)	0	15.4 (4/2)*	2 (1/1)	0	7.1 (4/1)	4.2 (1/1)

^a LM% = litter mean % - average percentage of affected fetuses per litter. Values in parentheses are (number affected fetuses/number of affected litters). * $p \leq 0.05$ /** $p \leq 0.01$ /***/ $p \leq 0.001$. In the skeletal evaluation, the abnormalities marked with ^(V) are considered teratological variations while the abnormalities marked with ^(M) are considered malformations. bwt= body weight. oc= ossification center.

References

- [1] AlKadi HO. Antimalarial drug toxicity: a review. *Chemotherapy*. 2007;53:385-91.
- [2] Nosten F, White NJ. Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:181-92.
- [3] Brabin B, Piper C. Anaemia- and malaria-attributable low birthweight in two populations in Papua New Guinea. *Ann Hum Biol*. 1997;24:547-55.
- [4] Deen JL, von Seidlein L. Antimalarial use during pregnancy and its effect on birthweight. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96:573-4.
- [5] Deen JL, von Seidlein L, Pinder M, Walraven GE, Greenwood BM. The safety of the combination artesunate and pyrimethamine-sulfadoxine given during pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001;95:424-8.
- [6] Bialek R, Knobloch J. [Parasitic infections in pregnancy and congenital protozoan infections. Part I.: Protozoan infections]. *Z Geburtshilfe Neonatol*. 1999;203:55-62.
- [7] Meshnick SR, Taylor TE, Kamchonwongpaisan S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol Rev*. 1996;60:301-15.
- [8] Clark RL. Embryotoxicity of the artemisinin antimalarials and potential consequences for use in women in the first trimester. *Reprod Toxicol*. 2009;28:285-96.
- [9] Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Declining artesunate-mefloquine efficacy against falciparum malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:716-9.
- [10] Lim P, Alker AP, Khim N, Shah NK, Incardona S, Doung S, et al. Pfm^{dr1} copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in falciparum malaria in Cambodia. *Malar J*. 2009;8:11.

- [11] Rogers WO, Sem R, Tero T, Chim P, Lim P, Muth S, et al. Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia. *Malar J*. 2009;8:10.
- [12] Ashley EA, White NJ. Artemisinin-based combinations. *Curr Opin Infect Dis*. 2005;18:531-6.
- [13] WHO. World Health Organization Guidelines for the treatment of malaria. <http://www.who.int/malaria/docs/TreatmentGuidelines2006.pdf>; 2006.
- [14] Clark RL, White TE, S AC, Gaunt I, Winstanley P, Ward SA. Developmental toxicity of artesunate and an artesunate combination in the rat and rabbit. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2004;71:380-94.
- [15] Clark RL, Lerman SA, Cox EM, Gristwood WE, White TE. Developmental toxicity of artesunate in the rat: comparison to other artemisinins, comparison of embryotoxicity and kinetics by oral and intravenous routes, and relationship to maternal reticulocyte count. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2008;83:397-406.
- [16] White TE, Clark RL. Sensitive periods for developmental toxicity of orally administered artesunate in the rat. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2008;83:407-17.
- [17] White TE, Bushdid PB, Ritter S, Laffan SB, Clark RL. Artesunate-induced depletion of embryonic erythroblasts precedes embryoletality and teratogenicity in vivo. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2006;77:413-29.
- [18] Palmer KJ, Holliday SM, Brogden RN. Mefloquine. A review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*. 1993;45:430-75.
- [19] Phillips-Howard PA, Wood D. The safety of antimalarial drugs in pregnancy. *Drug Saf*. 1996;14:131-45.

- [20] Nosten F, Vincenti M, Simpson J, Yei P, Thwai KL, de Vries A, et al. The effects of mefloquine treatment in pregnancy. *Clin Infect Dis*. 1999;28:808-15.
- [21] McGready R, Brockman A, Cho T, Cho D, van Vugt M, Luxemburger C, et al. Randomized comparison of mefloquine-artesunate versus quinine in the treatment of multidrug-resistant falciparum malaria in pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94:689-93.
- [22] WHO. Guidelines for the treatment of malaria. 2 ed. Geneva: World Health Organization; 2010.
- [23] Nevill AM. The need to scale for differences in body size and mass: an explanation of Kleiber's 0.75 mass exponent. *J Appl Physiol*. 1994;77:2870-3.
- [24] Makris SL, Solomon HM, Clark R, Shiota K, Barbellion S, Buschmann J, et al. Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 2). *Congenit Anom (Kyoto)*. 2009;49:123-246.
- [25] Staples RE, Haseman JK. Commentary: Selection of appropriate experimental units in teratology. *Teratology*. 1974;9:259-60.
- [26] Wilson JG. Embryological Considerations in Teratology. *Ann N Y Acad Sci*. 1965;123:219-27.
- [27] Staples RE, Schnell VL. Refinements in Rapid Clearing Technic in the Koh-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technol*. 1964;39:61-3.
- [28] McGready R, Cho T, Cho JJ, Simpson JA, Luxemburger C, Dubowitz L, et al. Artemisinin derivatives in the treatment of falciparum malaria in pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1998;92:430-3.
- [29] McGready R, Nosten F. The Thai-Burmese border: drug studies of *Plasmodium falciparum* in pregnancy. *Ann Trop Med Parasitol*. 1999;93 Suppl 1:S19-23.

- [30] Dellicour S, Hall S, Chandramohan D, Greenwood B. The safety of artemisinins during pregnancy: a pressing question. *Malar J*. 2007;6:15.
- [31] Nosten F, Hien TT, White NJ. Use of artemisinin derivatives for the control of malaria. *Med Trop (Mars)*. 1998;58:45-9.
- [32] Ward SA, Sevene EJ, Hastings IM, Nosten F, McGready R. Antimalarial drugs and pregnancy: safety, pharmacokinetics, and pharmacovigilance. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:136-44.
- [33] Vanhauwere B, Maradit H, Kerr L. Post-marketing surveillance of prophylactic mefloquine (Lariam) use in pregnancy. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;58:17-21.
- [34] Nosten F, ter Kuile F, Maelankiri L, Chongsuphajaisiddhi T, Nopdonrattakoon L, Tangkitchot S, et al. Mefloquine prophylaxis prevents malaria during pregnancy: a double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis*. 1994;169:595-603.
- [35] Steketee RW, Wirima JJ, Slutsker L, Khoromana CO, Heymann DL, Breman JG. Malaria treatment and prevention in pregnancy: indications for use and adverse events associated with use of chloroquine or mefloquine. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55:50-6.
- [36] Staples R. Detection of visceral alterations in mammalian fetuses. *Teratology*. 1974;9:37-8.
- [37] Solomon HM, Wier PJ, Fish CJ, Hart TK, Johnson CM, Posobiec LM, et al. Spontaneous and induced alterations in the cardiac membranous ventricular septum of fetal, weanling, and adult rats. *Teratology*. 1997;55:185-94.
- [38] Burk O, Arnold KA, Nussler AK, Schaeffeler E, Efimova E, Avery BA, et al. Antimalarial artemisinin drugs induce cytochrome P450 and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol*. 2005;67:1954-65.

- [39] Li XQ, Bjorkman A, Andersson TB, Gustafsson LL, Masimirembwa CM. Identification of human cytochrome P(450)s that metabolise anti-parasitic drugs and predictions of in vivo drug hepatic clearance from in vitro data. *Eur J Clin Pharmacol*. 2003;59:429-42.
- [40] Ilett KF, Ethell BT, Maggs JL, Davis TM, Batty KT, Burchell B, et al. Glucuronidation of dihydroartemisinin in vivo and by human liver microsomes and expressed UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos*. 2002;30:1005-12.
- [41] Davis TM, England M, Dunlop AM, Page-Sharp M, Cambon N, Keller TG, et al. Assessment of the effect of mefloquine on artesunate pharmacokinetics in healthy male volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:1099-101.
- [42] Longo M, Zanoncelli S, Manera D, Brughera M, Colombo P, Lansen J, et al. Effects of the antimalarial drug dihydroartemisinin (DHA) on rat embryos in vitro. *Reprod Toxicol*. 2006;21:83-93.
- [43] Longo M, Zanoncelli S, Torre PD, Riflettuto M, Cocco F, Pesenti M, et al. In vivo and in vitro investigations of the effects of the antimalarial drug dihydroartemisinin (DHA) on rat embryos. *Reprod Toxicol*. 2006;22:797-810.

5.4.1 Material complementar

5.4.1.1 Highlights

Pregnant rats were treated with artesunate, mefloquine and their association.

Artesunate induced embryolethality and bones malformations.

Mefloquine induced maternal toxicity with no fetus anomalies.

The artesunate/mefloquine combination resulted in a reduced developmental toxicity.

5.4.1.2 Graphic abstract

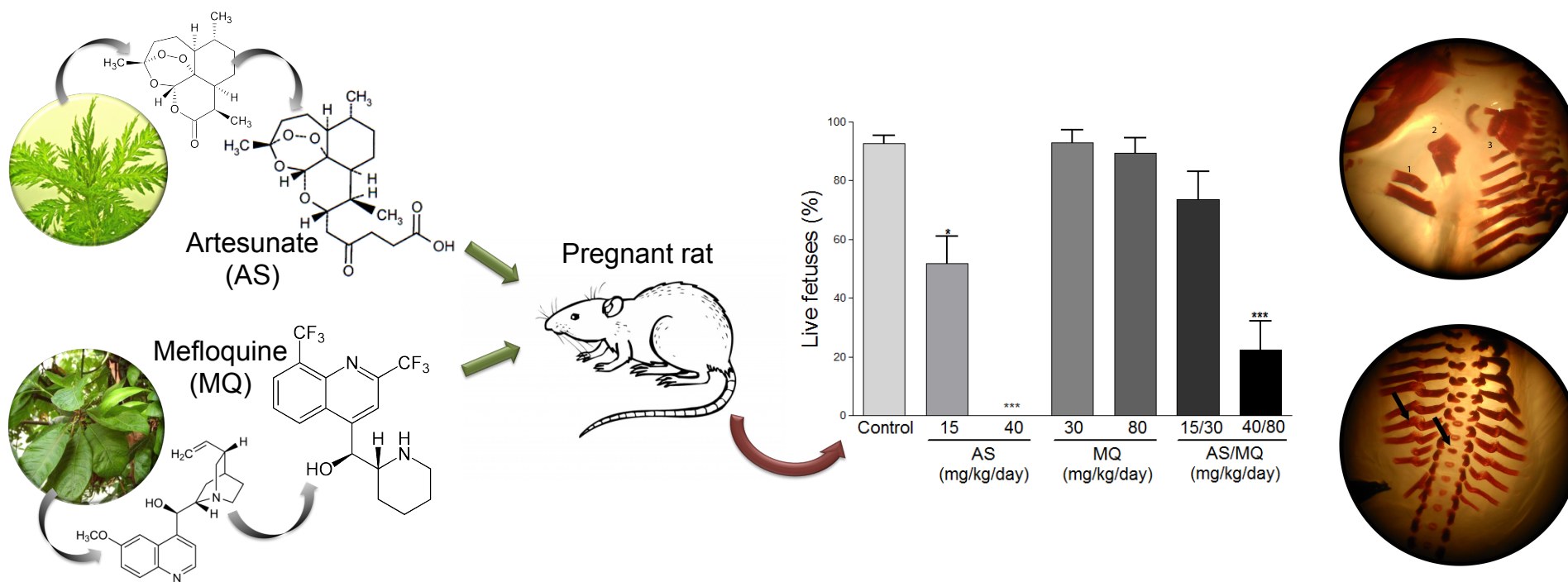


FIGURA 8. GRAPHIC ABSTRACT.

5.4.1.3 TABELAS E FIGURAS COMPLEMENTARES

TABELA 1. ANOMALIAS EXTERNAS OBSERVADAS NOS FETOS EXPOSTOS AO ARTESUNATO, À MEFLOQUINA E À ASSOCIAÇÃO ARTESUNATO/MEFLOQUINA NOS DIAS GESTACIONAIS 9-11.

Grupos	Controle	Artesunato	Mefloquina		Artesunato/Mefloquina	
Doses		15 mg/kg	30 mg/kg	80 mg/kg	15/30 mg/kg	40/80 mg/kg
Fetos/ninhadas	243/23	141/16	192/19	156/18	168/14	45/4
Anomalias externas % (fetos/ninhadas) ^a						
Hidropsia, generalizado	0	0,7 (1/1)	0	0,6 (1/1)	0	0
Aplasia cutânea	0,8 (2/2)	0	0,5 (1/1)	0	1,2 (2/1)	0
Despigmentação da pele	0	0	0	0,6 (1/1)	0	0
Coágulos, hematomas	2,1 (5/3)	6,4 (9/6)	5,7 (11/9)	1,2 (2/2)	4,8 (8/6)	0
Gastrosquise	0	0,7 (1/1)	0,5 (1/1)	0	0	0
Patras flexionadas	0	0,7 (1/1)	0	0	0	0

^aValores entre parênteses representam (número de fetos afetados/número de ninhadas afetadas). Os fetos foram eutanaziados no dia 20 de gestação.

TABELA 2. ANOMALIAS VISCERAIS OBSERVADAS NOS FETOS EXPOSTOS AO ARTESUNATO, À MEFLOQUINA E À ASSOCIAÇÃO ARTESUNATO/MEFLOQUINA NOS DIAS GESTACIONAIS 9-11.

Grupos Doses	Controle	Artesunato	Mefloquina		Artesunato/Mefloquina	
		15 mg/kg	30 mg/kg	80 mg/kg	15/30 mg/kg	40/80 mg/kg
Fetos/ninhadas	72/23	43/15	62/18	49/18	52/15	13/4
Massa fetal (g) ^a	3,3 ± 0,1	2,90* ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,0 ± 0,2
Massa absoluta dos órgãos ^a						
Fígado (g)	0,31 ± 0,01	0,26* ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,01
Rins (g)	0,018 ± 0,007	0,015 ± 0,001	0,016 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,017 ± 0,001	0,014 ± 0,001
Timo (mg)	4,0 ± 0,2	3,7 ± 0,3	4,0 ± 0,3	3,8 ± 0,2	4,2 ± 0,2	4,0 ± 0,4
Pulmão (g)	0,089 ± 0,003	0,066* ± 0,004	0,081 ± 0,003	0,075 ± 0,003	0,076 ± 0,006	0,065* ± 0,005
Coração (g)	0,024 ± 0,008	0,014 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,016 ± 0,001	0,017 ± 0,003
Massa relativa dos órgãos (%) ^a						
Fígado	9,3 ± 0,2	8,9 ± 0,2	8,5 ± 0,2	8,0 ± 0,2	8,7 ± 0,3	9,1 ± 0,3
Rins	0,53 ± 0,02	0,52 ± 0,03	0,45 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,56 ± 0,02	0,47 ± 0,02
Timo	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,02
Pulmão	2,7 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1
Coração	0,67 ± 0,20	0,48 ± 0,03	0,46 ± 0,02	0,40 ± 0,02	0,51 ± 0,02	0,59 ± 0,01
Anomalias viscerais % (fetos/ninhadas) ^b						
Hemorragia intra-torácica	0,8 (2/2)	1,4 (2/2)	2,1 (5/4)	0,6 (1/1)	3,6 (8/6)	2,2 (1/1)
Hemorragia abdominal	0	0	1,0 (2/2)	2,4 (4/4)	0,6 (1/1)	4,4 [†] (2/2)
Hemorragia cerebral	0	0	0,5 (1/1)	0	0,6 (1/1)	0
Microftalmia	0,4 (1/1)	0	0	0,6 (1/1)	0	0
Coração malposicionado	0,4 (1/1)	0,7 (1/1)	0	0	0	2,2 (1/1)
Fígado com coloração alterada	0	1,4 (4/2)	0	0	1,2 (1/1)	0

TABELA 2. ANOMALIAS VISCERAIS OBSERVADAS NOS FETOS EXPOSTOS AO ARTESUNATO, À MEFLOQUINA E À ASSOCIAÇÃO ARTESUNATO/MEFLOQUINA NOS DIAS GESTACIONAIS 9-11. (Continuação).

Timo disforme	0	0	0	0	0,6 (1/1)	0
Testículo esquerdo malposicionado	0	0	0	0	0,6 (1/1)	0

^a Valores representam média \pm erro padrão da média. ^b Valores entre parênteses representam (número de fetos afetados/número de ninhadas afetadas). Os fetos foram eutanaziados no dia 20 de gestação. * $p \leq 0.05$ (Kruskal-Wallis seguido por Dunn's Multiple Comparison Test). [†] $p \leq 0.05$ (Teste χ^2).

TABELA 3. RETARDO DE OSSIFICAÇÃO OBSERVADO NOS FETOS EXPOSTOS AO ARTESUNATO, À MEFLOQUINA E À ASSOCIAÇÃO ARTESUNATO/MEFLOQUINA NOS DIAS GESTACIONAIS 9-11

Grupos Doses	Controle	Artesunato	Mefloquina		Artesunato/Mefloquina	
		15 mg/kg	30 mg/kg	80 mg/kg	15/30 mg/kg	40/80 mg/kg
Fetos/ninhadas	152/21	92/13	119/17	93/16	107/14	28/4
Retardo de ossificação % (fetos/ninhadas) ^a						
Crânio						
Basoccipital, pc	0	3,3 (3/2)	0	1,1 (1/1)	0	0
Basisfenóide, pc	0,7 (1/1)	38,5*** (12/5)	0	12,5 (4/2)	21,5*** (6/23)	0
Exoccipital, pc	1,3 (2/2)	5,4 (4/5)	0	1,1 (1/1)	0	0
Frontal, pc	60,5 (92/16)	100*** (92/13)	73,1 (87/13)	54,8 (51/12)	100*** (107/14)	100*** (28/4)
Hióide, pc	2,0 (3/1)	1,1 (1/1)	0	0	0	3,6 (1/1)
Interparietal, pc	2,6 (4/3)	3,3 (3/1)	0	0	0	3,6 (1/1)
Maxilar, pc	100 (152/21)	100 (92/13)	100 (119/17)	100 (93/16)	100 (107/14)	100 (28/4)
Nasal, pc	0	1,1 (1/1)	2,5 (3/2)	5,4* (5/1)	0	0
Parietal, pc	97,4 (148/21)	95,7 (88/13)	100 (119/17)	100 (93/16)	100 (107/14)	100 (28/4)
Premaxilla, pc	100 (152/21)	100 (92/13)	100 (119/17)	100 (93/16)	100 (107/14)	100 (28/4)
Squamosal, pc	2,6 (4/2)	10,9* (10/5)	3,7 (4/2)	1,1 (1/1)	11,2* (12/5)	10,8* (3/2)
Supraoccipital, pc	3,0 (6/2)	9,8 (7/9)	9,2 (11/8)	1,1 (1/1)	2,8 (3/1)	7,1 (2/1)
Vomer, pc	1,3 (2/2)	13,0*** (12/5)	5,9 (7/5)	14,0*** (13/6)	9,3 (10/7)	0
Zigomático, pc	0,7 (1/1)	0	3,7 (4/2)	1,1 (1/1)	0	0
Clavícula, pc	0	4,3* (4/1)	0	0	0	3,6 (1/1)
Esternebra						
1, pc	2,6 (4/3)	17,4*** (16/7)	5,9 (7/6)	20,4*** (19/6)	8,4 (9/4)	39,3*** (11/2)
2, pc	19,7 (30/12)	30,4 (28/11)	16,8 (20/10)	25,8 (24/7)	8,4 (9/6)*	42,9*** (12/3)

TABELA 3. RETARDO DE OSSIFICAÇÃO OBSERVADO NOS FETOS EXPOSTOS AO ARTESUNATO, À MEFLOQUINA E À ASSOCIAÇÃO ARTESUNATO/MEFLOQUINA NOS DIAS GESTACIONAIS 9-11. (Continuação)

3, pc	3,3 (5/4)	17,4*** (16/6)	10,1 (12/4)	20,4*** (19/7)	15,0*** (16/5)	42,9*** (12/2)
4, pc	4,6 (7/5)	33,7*** (31/9)	6,7 (8/6)	31,2*** (29/9)	24,3*** (26/7)	46,4*** (13/3)
5, pc	71,7 (109/20)	100*** (92/13)	88,2*** (105/17)	68,8 (64/14)	62,6 (67/13)	96,4*** (27/4)
6, pc	98,0 (149/21)	100 (92/13)	100 (119/17)	100 (93/16)	100 (107/14)	100 (28/4)
Costelas, pc	0	22,8*** (21/5)	0	0	1,9 (3/2)	25,0 (7/2)***
Vertebras						
Atlas, pc	1,3 (2/2)	6,5 (6/6)	0	0	4,7 (5/3)	17,8*** (5/2)
Cervical, pc	3,9 (6/5)	2,2 (2/2)	0,8 (1/1)	0	1,9 (2/2)	7,1 (2/1)
Torácica, pc	3,2 (3/3)	3,2 (3/3)	0,8 (1/1)	2,2 (2/1)	6,5 (7/5)	3,6 (1/1)
Lombar, pc	3,9 (6/3)	27,2*** (6/25)	0,8 (1/1)	0	6,5 (7/3)	7,1 (2/1)
Sacral, pc	10,5 (16/8)	34,8*** (32/11)	2,5 (3/3)	3,2 (3/3)	12,1 (13/8)	7,1 (2/1)
Cintura pélvica						
Ílio, pc	0	10,9* (10/2)	0,8 (1/1)	0	0	7,1** (2/1)
Ísquio, pc	0	8,7*** (8/3)	7,6** (9/2)	1,1 (1/1)	6,5** (7/2)	14,3*** (4/1)
Pubis, pc	14,5 (22/9)	10,9 (10/5)	15,1 (18/7)	9,7 (9/6)	50,5*** (54/6)	100*** (28/4)
Membros posteriores						
Fíbula, pc	0	5,4* (5/2)	1,7 (2/2)	0	0	3,6 (1/1)
Tíbia, pc	0	4,3* (4/2)	0,8 (1/1)	0	3,7 (4/1)	3,6 (1/1)

^a Valores entre parênteses representam (número de fetos afetados/número de ninhadas afetadas). Os fetos foram eutanaziados no dia 20 de gestação.

*p≤0.05; *p≤0.01; *p≤0.001 (Teste χ^2). pc = pobremente ossificado.

TABELA 4. ALTERAÇÕES E VARIAÇÕES DE OSSIFICAÇÃO OBSERVADOS NOS FETOS EXPOSTOS AO ARTESUNATO, À MEFLOQUINA E À ASSOCIAÇÃO ARTESUNATO/MEFLOQUINA NOS DIAS GESTACIONAIS 9-11.

Grupos Doses	Controle	Artesunato	Mefloquina		Artesunato/Mefloquina	
		15 mg/kg	30 mg/kg	80 mg/kg	15/30 mg/kg	40/80 mg/kg
Fetos/ninhadas	152/21	92/13	119/17	93/16	107/14	28/4
Anomalias esqueléticas % (fetos/ninhadas) ^a						
Crânio						
Basoccipital, buraco	0,7 (1/1)	0	0	0	0	3,6 (1/1)
Exoccipital, buraco	0,7 (1/1)	2,1 (2/1)	0	0	0	3,6 (1/1)
Frontal, desalinhado	0	1,1 (1/1)	0	0	0	0
Frontal, oi	7,9 (12/5)	18,5 (17/7)*	2,5 (3/1)	9,7 (9/4)	7,5 (8/3)	14,3 (4/4)
Nasal, oi	0	1,1 (1/1)	0	0	0	0
Clavícula, oi	1,3 (8/4)	5,4 (5/2)	0	0	0	3,6 (1/1)
Escápula						
Curvada	0	12,0 (11/2)***	0	0	0	0
io	0	1,1 (1/1)	0	1,1 (1/1)	0	0
Membros anteriores						
Húmero, curvado	0	12,0 (11/4)***	0	0	0	0
Húmero, buraco	38,8 (59/16)	51,1 (47/11)	31,1 (37/12)	47,3 (44/16)	34,6 (37/12)	14,3 (4/2)
Rádio, curvado	0	6,5 (6/2)**	0	0	0	0
Rádio, oi	0,7 (1/1)	0	0	0	0	0
Falanges, curvadas	0,7 (1/1)	0	0	0	0	0
Ulna, curvada	0	4,3 (4/12)**	0	0	0	0
Esternebras						

TABELA 4. ALTERAÇÕES E VARIAÇÕES DE OSSIFICAÇÃO OBSERVADOS NOS FETOS EXPOSTOS AO ARTESUNATO, À MEFLOQUINA E À ASSOCIAÇÃO ARTESUNATO/MEFLOQUINA NOS DIAS GESTACIONAIS 9-11. (Continuação).

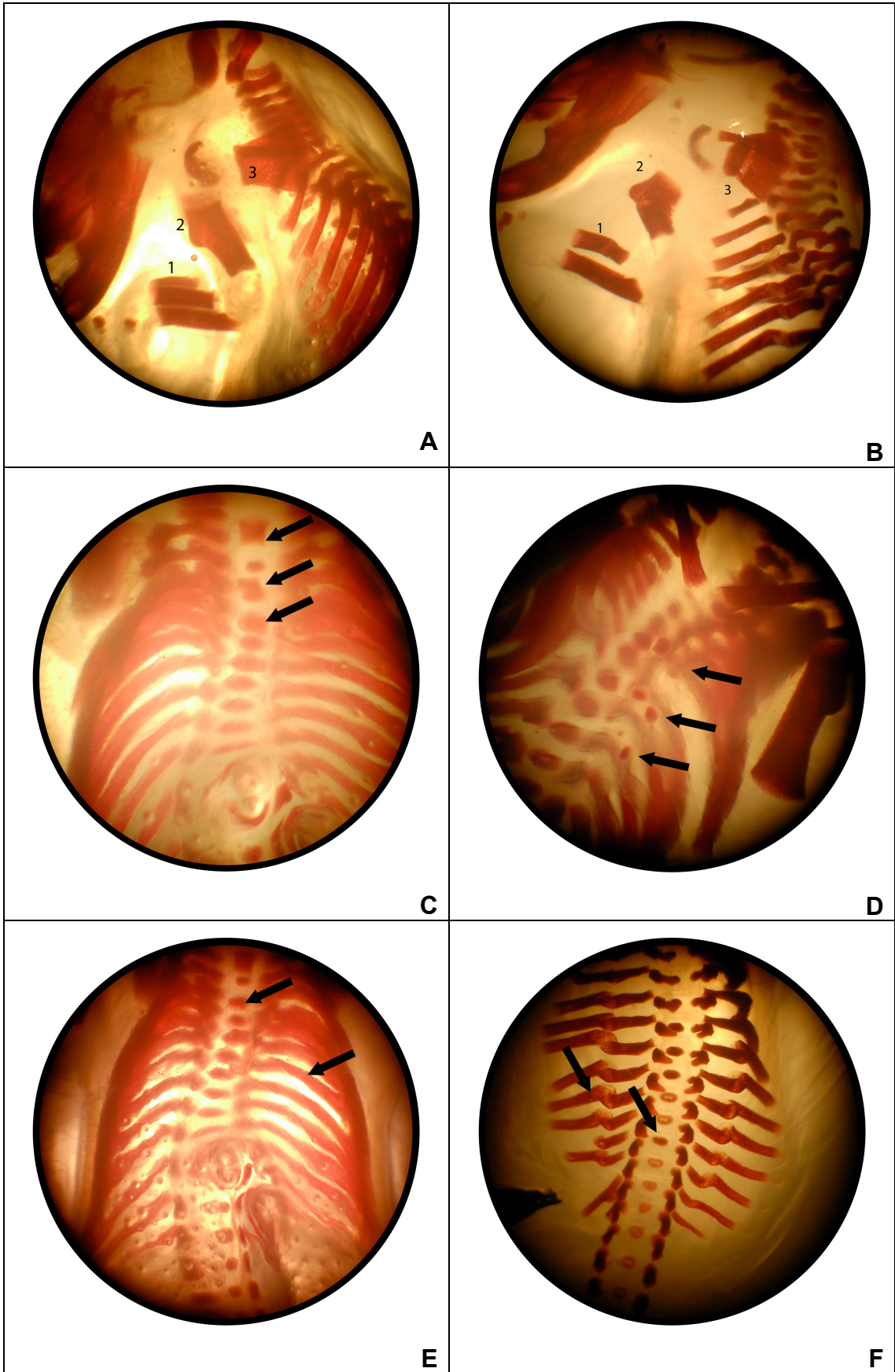
1, oi	15,1 (23/14)	58,7 (54/11)***	5,9 (7/3)	6,5 (6/5)	44,9 (48/13)***	12,3 (4/2)
2, oi	40,1 (61/16)	58,7 (54/10)**	12,6 (15/9)	41,9 (39/11)*	43,9 (47/12)***	42,9 (12/3)
3, oi	20,4 (31/10)	68,5 (63/12)***	10,1 (12/8)	16,1 (15/9)	29,9 (32/10)	25,0 (7/3)
4, oi	38,8 (59/20)	72,8 (67/12)***	27,7 (33/14)	53,8 (50/15)	43,9 (47/12)	67,9 (19/4)
5, oi	79,6 (121/19)	21,7 (20/7)	46,2 (55/16)	38,7 (36/11)	61,7 (66/11)	82,1 (23/4)
6, oi	0,7 (1/1)	0	0,8 (1/1)	0	0	0
Costelas						
Costelas, disformes	0	4,3 (4/2)**	2,2 (2/1)	0	0	0
Costelas, onduladas	12,5 (19/11)	39,1 (36/11)***	10,1 (12/7)	10,8 (10/5)	49,5 (53/10)***	17,9 (5/3)
Costelas, na lombar	48,7 (73/17)	53,3 (49/11)	45,4 (54/12)	30,1 (28/13)	54,2 (58/11)	35,7 (10/4)
Vertebras						
Atlas, oi	2,0 (3/2)	13,0 (12/4)***	0,8 (1/1)	0	0	0
Axis, oi	0	0	0	0	3,7 (4/1)	0
Cervical, constrição	36,5 (57/9)	91,3 (84/11)***	36,1 (43/8)	46,2 (43/9)	33,6 (36/9)	100 (28/4)***
Cervical, oi	2,0 (3/1)	19,6 (18/6)***	5,0 (6/2)	3,2 (3/1)	0	7,1 (2/2)
Cervical, descontínua	0	1,1 (1/1)	5,9 (7/1)**	0	3,7 (4/1)	0
Torácica, descontínua	0	6,5 (6/4)**	0	0	0	0
Torácica, Dumbell	0	2,2 (2/2)	0	0	0	0
Torácica, oi	0	1,1 (1/1)	0	0	0	0
Lombar, descontínua	0	13,0 (12/4)***	0	0	0	0
Lombar, oi	0	9,8 (9/3)***	0	0	0	0
Sacral, oi	0	1,1 (1/1)	0	0	0	0
Escoliose	2,6 (4/4)	1,1 (1/1)	0	1,1 (1/1)	0	0

TABELA 4. ALTERAÇÕES E VARIAÇÕES DE OSSIFICAÇÃO OBSERVADOS NOS FETOS EXPOSTOS AO ARTESUNATO, À MEFLOQUINA E À ASSOCIAÇÃO ARTESUNATO/MEFLOQUINA NOS DIAS GESTACIONAIS 9-11. (Continuação).

Cintura pélvica						
Íleo, oi	0	2,2 (2/2)	0	0	0	0
Púbis, oi	0	6,5 (6/3)**	2,5 (3/2)	0	0	0
Membros posteriores						
Fêmur, curado	0	1,1 (1/1)	0	0	0	0
Fêmur, oi	0	4,3 (4/3)*	0	0	0	0
Falanges, curvadas	1,3 (2/2)	1,1 (1/1)	0	0	0	0

^a Valores entre parênteses representam (número de fetos afetados/número de ninhadas afetadas). Os fetos foram eutanaziados no dia 20 de gestação.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ (Teste χ^2). oi = ossificação irregular.



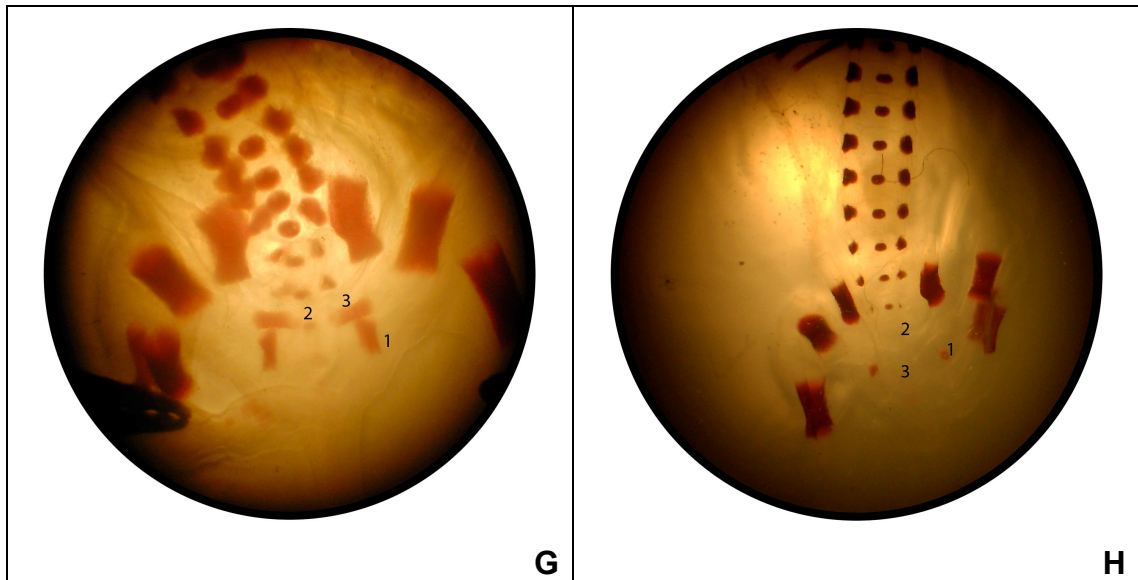


FIGURA 9. MALFORMAÇÕES ESQUELÉTICAS INDUZIDAS PELO ARTESUNATO. A: Rádio (1), humero (2) e escápula (3) normais, provenientes de um feto controle; B: Rádio (1), humero (2) e escápula (3) de um feto exposto *in utero* a 15 mg/kg/dia de artesunato nos dias 9-11 de gestação; C: esternebra (setas) de um feto controle; D: esternebra com ossificação incompleta (setas) após exposição a 15 mg/kg/dia de artesunato nos dia 9-11 de gestação; E: vértebra torácica e costelas (setas) de feto controle; F: *Dumbell* e costelas onduladas (setas) de um feto exposto *in utero* a 15 mg/kg/dia de artesunato nos dias 9-11 de gestação; G: ísquio (1), vértebra caudal (2) e púbis (3) de feto controle; H: ísquio (1), vértebra caudal (2) e púbis (3) após exposição a 15 mg/kg/dia de artesunato nos dia 9-11 de gestação.

5.5 ARTIGO 2:

Artigo científico submetido para publicação na revista *Human and Experimental Toxicology*.

8/31/12

ScholarOne Manuscripts

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Logout](#) | [Online Help](#)

Human and Experimental Toxicology

 Powered by
SCHOLARONE™
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Ana Boareto

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Human and Experimental Toxicology*.

Manuscript ID: HET-12-0445


Title: Effects of the combined artesunate and mefloquine antimalarial drugs on rat embryos

Boareto, Ana
Muller, Juliane
Lourengo, Emerson
Lombardi, Natália
Authors: Lourenço, Ana
Rabitto, Inês
de Moraes, Rosana
Rios, Flavia
Dalsenter, Paulo

Date Submitted: 31-Aug-2012

 Print  Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.9.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

Effects of the combined artesunate and mefloquine antimalarial drugs on rat embryos

Running title: Effects of artesunate and mefloquine on rat embryo

Ana Cláudia Boareto ^a, Juliane Centeno Müller ^a, Emerson Luiz Botelho Lourenço ^a,
Natália Lombardi ^a, Ana Carolina Lourenço ^a, Inês Rabitto ^a, Rosana Nogueira de
Morais ^b, Flavia Sant'Anna Rios ^c, Paulo Roberto Dalsenter ^a

^a Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, P.O. Box 19031, CEP 81531-990 Curitiba, PR, Brazil.

^b Department of Physiology, Federal University of Paraná, CEP 81531-990 Curitiba, PR, Brazil.

^c Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, CEP 81531-990 Curitiba, PR, Brazil.

*Corresponding author:

E-mail address: boaretoana@gmail.com (Ana Cláudia Boareto)

Phone: 55(41)3361-1716

Department of Pharmacology, Federal University of Paraná

PO Box 19031, 81531-990 Curitiba/PR, Brazil

Abstract

Artemisinin combination therapy (ACTs) is the first choice therapy for *falciparum* malaria. Data on safety of ACTs in pregnancy are limited and controversial and the use is not recommended on the first trimester. To evaluate the effects of isolated and combined artesunate/mefloquine on embryo rats, pregnant rats were treated orally with artesunate (AS) (15 and 40 mg/kg bwt/day), mefloquine (MQ) (30 and 80 mg/kg bwt/day) and artesunate-mefloquine (AS/MQ) (15/40 and 40/80 mg/kg bwt/day) on days 9 to 11 *post coitum* (pc). The dams were euthanized on day 12 pc and gestational and embryos histological parameters were evaluated. Embryo lethality and histopathological anomalies were significant when artesunate was given alone or combined with mefloquine. Combination of artesunate and mefloquine did not enhance their toxicity compared to their separate administrations; on the other side, there was a reduction of the toxic effects of the artesunate when combined with mefloquine. Isolated mefloquine did not induce developmental toxicity.

Keywords: artesunate; mefloquine; antimalarial; embryo lethality; histopathology.

1 Introduction

Malaria remains one of the most important infectious diseases in the world. *Plasmodium falciparum*, which is responsible for causing severe forms of the disease, is the cause of nearly all of the 1–3 million malaria-related deaths each year.¹ *P. falciparum* is also adept in developing resistance to drugs, thereby decreasing their efficacy in treatment over a period of time.² The simultaneous administration of multiple drugs (combination chemotherapy) combats the development of resistance by preventing the survival of mutated parasites with resistance to a single drug.³

Pregnant women are in particular risk for adverse malarial outcomes, including death. Malaria during pregnancy is also associated with adverse consequences for the conceptus including intrauterine death, stillbirth, preterm labor, and low birth weight, as well as vertical transmission of the disease.⁴

Artesunate, dihydroartemisinin (DHA), artemether and arteether are semi-synthetic derivatives of artemisinin, which, in nature, is found in leaves and flowers of *Artemisia annua* L.⁵ DHA is the major active metabolite common to several artemisinins including artesunate, which is the succinate ester of DHA.⁶ Since artemisinins are potent and rapidly acting drugs to which there have been few cases of resistance,^{7–9} they have become one of the most important groups of drugs available to treat malaria. The World Health Organization (WHO) has recommended that artemisinin-containing combination therapies (ACTs) should be used to treat *P. falciparum* in areas of drug resistance.¹⁰

Developmental toxicity has been studied for artesunate and mefloquine isolated. The artemisinins common effect observed is a dose-related increase in post-implantation loss, with total resorptions at higher dose levels. Some studies

show morphological abnormalities at doses that cause fetal resorptions, without maternal toxicity.¹¹⁻¹⁴ All studies using artesunate show a steep dose-response curve and some have demonstrated marked sensitivity on the day of dosing between days 10-14 *post coitum* (pc) of gestation in the rat.¹⁵ Within this window, day 10 pc is the most sensitive day for teratogenic effects and day 11 pc the most sensitive day for embryolethality.^{12,16}

Different laboratories investigated the mechanism of developmental toxicity of artemisinins in animals. These studies showed that embryonic erythroblast were the primary target of artemisinin toxicity in rat embryos exposed *in vivo*.^{17,18} The hypothesis is that the reduction of red blood cells and associated anemia led to the observed embryolethality or cell damage, causing heart abnormalities (swollen or collapsed chambers), cardiac myopathy and delays in limb and tail development.^{14,16}

The use of the mefloquine has increased in recent years because of the spread of *P. falciparum* strains that are resistant to other available drugs. Mefloquine is prescribed widely as prophylaxis for malaria in travelers and for the treatment of uncomplicated *P. falciparum* infections in association with artesunate.¹⁰ The toxicity of mefloquine has been studied extensively and the drug is relatively well-tolerated.^{19,20} Severe central nervous system events requiring hospitalization (e.g. seizures and hallucinations) occur in 1:10,000 patients taking mefloquine as chemoprophylaxis.² In pregnancy, mefloquine was demonstrated to be teratogenic in animal studies at 5–20 times the recommended dosage for humans.¹⁹ Studies on the use of mefloquine in prophylaxis during the second half of pregnancy have concluded that the drug is safe, but there are few data on the effects of fetal exposure to mefloquine given for the treatment of malaria during early gestation.²¹

Studies on the safety of the association of the artesunate and mefloquine are

performed, mostly, in non-pregnant subjects; there is few data to support a proper comparison of developmental toxicity of this association. WHO, in 2006, published an assessment of the safety of artemisinin compounds in pregnancy and recommended more detailed studies on the possible interactions of artemisinins and the associated antimalarials, as mefloquine.²² According to the WHO, all artemisinins will be used in combination with other antimalarials in the treatment of uncomplicated malaria, however the possibilities of interactions must be considered.

A major concern about the safety of the artesunate/mefloquine association is the possibility of interactions between the components. Pregnancy is associated with changes in several drugs pharmacokinetics, and, in the case of the artesunate, the target of the developmental toxicity is, apparently, the embryonic erythroblasts, so interactions may not be observed in non-pregnant patients. The objective of this study was to investigate the developmental effects of the antimalarials artesunate and mefloquine and their association in the embryo exposed *in utero*, during the critical period of artemisinins developmental toxicity.

2 Materials and Methods

2.1 Animals

All Wistar rats used in this study were from the Federal University of Paraná animal house breeding stock. Animals were maintained under controlled environmental conditions at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and a constant 12 h light/12 h dark cycle. Standard pellet food (Nuvital, Curitiba/PR, Brazil) and tap water were available *ad libitum*. The study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of Federal University of Paraná (Protocol number: 308/08). Female rats were placed in the male cage - at a ratio of 3:1 - for one hour at the end of the dark period. Mating was confirmed by the presence of sperm in vaginal smears and the day on which sperm was detected was considered day 0 pc. Pregnant females were randomly assigned to control and treatment groups. Maternal weight was monitored daily during gestation and all animals were observed for clinical signs of toxicity.

2.2 Drugs and treatment

Artesunate (artesunic acid; Knoll/Abbot, Lot No. 2.05) and mefloquine (mefloquine chloridrate; Sifavitor, Lot No. 8700/13/09) were supplied by FIOCRUZ/PDTIS (Rio de Janeiro/RJ, Brazil). Suspension of artesunate 1% carboxymethyl cellulose and suspension of mefloquine in distilled water were prepared daily.

Experimental groups, with 15 females each, were as follows: (I) vehicle control; (II) artesunate 15 mg/kg bwt/day (AS15); (III) artesunate 40 mg/kg bwt/day (AS40); (IV) mefloquine 30 mg/kg bwt/day (MQ30); (V) mefloquine 80 mg/kg bwt/day

(MQ80); (VI) artesunate 15 mg/kg bwt/day plus mefloquine 30 mg/kg bwt/day (AS15/MQ30); (VII) artesunate 40 mg/kg bwt/day plus mefloquine 80 mg/kg bwt/day (AS40/MQ80). The doses of artesunate and mefloquine recommended by WHO (2010) for treatment during 3 consecutive days were artesunate 4 mg/kg and mefloquine 8 mg/kg (1:2).¹⁷ In the present study, the doses of artesunate were chosen taking into consideration the human therapeutic dose (4 mg/kg). The lower dose of artesunate (AS15) is the extrapolation of the human therapeutic dose to rat dose estimated by allometry ($4 \times 3,94 = 15,76$ mg/kg).²³ The higher dose (AS40) was 10-fold the human therapeutic dose, used for eventual inter-species differences. The mefloquine dose was based on the proportion of artesunate and mefloquine recommended by WHO (2010).¹⁷

All drugs were administered by gavage once a day from day 9 to 11 pc. The 3-day treatment regimen is consistent with a WHO (2010) recommendation for treatment of human malaria with artemisinin-containing combinations of drugs¹⁷. The volume administered was 5 mL/kg, based on the animal body weight on the day of dosing.

2.3 Cesarean section and embryo examination

Pregnant female were euthanized by decapitation and were submitted to cesarean section on day 12 pc. Blood was collected in heparinized tubes; plasma was removed after centrifugation, and immediately frozen at -20°C for hormonal analysis. Gravid uteri were removed and weighed. Implantation site, viable embryos and resorptions were counted. The criteria used to determine embryonic death was the presence of embryo severely deformed when examined under the stereomicroscope. Each uterus was cut along the antimesometrial borders and the

individual implantation sites removed with their decidual material. Each embryo was divested of remaining decidua under a stereomicroscope and observed for yolk sac vascularization and embryo viability and morphology under the stereomicroscope. Two viable embryos from each litter were collected and fixed in Methacan solution (methanol 60%, chloroform 30% and acetic acid 10%) for 24 h at 4°C for histological examination. The percentage of post-implantation losses was calculated. Selected organs were removed and weighed, including ovaries, liver, kidneys and adrenal glands. Organ weights were evaluated as absolute and relative weights [(organ weight/body weight) x 100)].

2.4 Histological analysis

Fixed embryos were washed and dehydrated three times in a bath of absolute ethanol for 30 minutes, followed by overnight bath in absolute ethanol/xylene (16 hours) at 4°C and three xylene diafanization baths for 30 minutes. The embryos were embedded in paraffin for 2 hours at 56°C and placed in paraffin blocks. Five to six embryos from each group were selected for histological analysis and completely sectioned, producing about 150-200 serial sagittal sections of 5 µm per embryo. All slides were stained with hematoxylin and eosin and each section was examined under light microscope. The remaining embryos were preserved but not analyzed. The histological photomicrographs were taken with a Leica EC 3 camera attached to a Leica DM 2500 light microscope and the software Leica Application Suite – LAS EZ 1.4. Results were expressed as a prevalence of histopathological alterations in each embryo, by an adaptation of Bernet and coworkers (1999).²⁴ This histopathology index is based on the sum of score rankings and importance factors for each lesion

found in the tissue. For each embryo investigated, the respective pathological changes were classified into three patterns, which include several alterations. These patterns are: (1) red blood cells alterations, including empty vessels or general reduced concentration of primitive erythroblasts and anomalies of erythroblast shape or color; (2) cell death, with general cell death areas and/or cell death in specific locations; (3) architectural and structural alterations of fetal selected organs, changes in tissue structure as well as in shape and arrangement of cells.

2.5 Hormone analysis

Plasma progesterone and testosterone levels were determined by enzyme immunoassay. Antibodies for progesterone (polyclonal anti-progesterone R4861; 1:10,000 dilution) and testosterone (polyclonal anti-testosterone R156/7; 1:7500 dilution) were obtained from Coralie Munro at the University of California, Davis, CA, USA. The progesterone antibody cross-reacted (at 50% binding) 47.3% with 11 α -hydroxyprogesterone, 0.4% with 17 α -hydroxyprogesterone, 0.2% with 20 α -hydroxyprogesterone, 2.4% with 20 β -hydroxyprogesterone, 39.0% with 5 α -pregnane-3,20-dione, 17.0% with 5 β -pregnane-3,20-dione, 0.003 % with 17 β -estradiol, 0.004% with androstenedione, 0.8% with testosterone, and 0.002% with cortisol. Cross-reactivities for anti-testosterone are: testosterone 100.0%, 5 α -dihydrotestosterone 57.4%, androstenedione 0.27%, and androsterone, dehydroepiandrosterone (DHEA), cholesterol, estradiol, progesterone and pregnenolone <0.05%. Serial dilutions of pooled plasma samples (n=35; 5 per group) produced displacement curves parallel to those of the appropriate standard. Inter- and intra-assay CVs were <10%. Assay

sensitivities were 0.78 and 2.3 pg/well for the progesterone and testosterone EIA, respectively.

2.6 Statistical analysis

Data from cesarean section and embryo parameters were tested for normal distribution by the D'Agostino & Person normality test. Parametric data were analyzed by analyses of variance (ANOVA), and differences between groups were assessed by the Tukey's Multiple Comparison test. Nonparametric data were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparison test. The data regarding the histopathological injury indexes were analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's Multiple Comparison test. Differences were considered statistically significant at a probability level of 5% ($p < 0.05$). The statistical analyses were performed using Prism version 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

3 Results

No signs of maternal toxicity were observed in control and treated animals. Expected weight gain occurred in all groups during pregnancy (table 1). There was a reduction on the relative maternal weight gain on day 12 pc on the groups treated with AS40 and the association AS40/MQ80, but this reduction was not statistically significant. Maternal organ weight (ovaries, liver, kidneys and adrenal gland) did not differ among groups (data not shown). There was no significant difference in the uterus weight with embryos among groups, and there was also no significant difference between the implantations number in control and treated female (table 1). Furthermore, no clinical or behavioral changes were observed in the treated animals.

Maternal progesterone and testosterone levels determined 24 hours after the last day of the treatment were not significantly different among the groups (table 1).

3.1.1 Control embryos

At the time of the cesarean section, all control animals showed well-developed embryos, there was rare occurrence of post-implantation losses (table 1). The yolk sacs were fully vascularized and not anemic when observed with the naked eye (figure 1-A) and under the stereomicroscope. Histological examination reveals normal tissue organization (table 2 and figure 4). The red blood cells visible in the sections of embryos examined were nucleated, indicating that they were primitive erythroblast (figure 1).

3.1.2 Artesunate exposed embryos

At both doses of artesunate the yolk sac was pale in part of the implants (table 1). Yolk sac vessels formation and circulation, observed with naked eye and under stereomicroscope, appeared normal, but was visibly paler than control group in approximately 40% of embryos exposed to AS15 and 80% in those exposed to AS40 (table 1 and figure 1-B).

In the animals treated with AS15 and AS40, respectively 30 and 40% of the embryos were dead at macroscopic observation (table 1), it was significantly different from the control group. The remaining embryos were viable, however some of them were pale when compared to the control group.

The surviving embryos that were histologically analyzed showed anomalies in the liver (figure 1) and heart (figure 2) architecture and some areas of cell death (figure 3). There was an overall relative reduction in erythroblasts compared to control embryo. The red blood cells were also pale and occasionally abnormally shaped (figure 1). In the same embryos that were observed reductions in the number of the red blood cells, it was also observed the cell death and the irregular architecture of the organs, showing a direct relationship among these parameters.

In the group exposed to AS15, three of the five analyzed embryos showed histological anomalies (table 2). These embryos presented anemia, with general reduced concentration of red blood cells and some empty vessels. Cell death was found at the splanchnic mesenchyme, spinal cord mesenchyme, central nervous system and pharyngeal arches. General cell death areas were found in one embryo. Irregular architecture in the histopathology was observed in the splanchnic mesenchyme and gut.

In the group exposed to AS40, four of the five analyzed embryos showed histological anomalies (table 2), and the histopathology index of these anomalies (10.5) was higher than the observed in the group treated with AS15 (2.8) (table 2 and figure 4). General reduced concentration of red blood cells was found, with almost no blood in some embryos and misshapen and pale red blood cells. Some embryos presented dilated and abnormally shaped heart; and liver and splanchnic mesenchyme abnormally shaped. Cell death was observed at the central nervous system, intermediate mesenchyme, mesenchyme surrounding aorta, pharyngeal arches, somites and splanchnic and gut. The system most affected by areas of cell death was the central nervous system. General cell death was found in one embryo.

3.1.3 Mefloquine exposed embryos

The animals treated with mefloquine, in the both doses, showed well-developed embryos, similar to the control group, with fully vascularized and not anemic yolk sac (table 1). Histological examination did not reveal alteration in the erythroblast and areas with cell death (table 2). Although there were two embryos affected with hydrocephalus, one in each mefloquine experimental group (table 2).

3.1.4 Artesunate plus Mefloquine exposed embryos

There was no significant difference in the number of post-implantations losses and viable embryos among the groups treated with isolate artesunate or artesunate plus mefloquine and both doses of these groups differ from the control group. In the same way, in both doses of artesunate associated with mefloquine, in part of the

implants, the yolk sac was pale. However, the group treated with the association of AS40MQ80 seems to be less affected than the group treated with AS40 isolated, but it was not statistically significant (table 1).

Some surviving embryos that were histologically analyzed showed areas of cell death, and there were fewer red blood cells than normal. The groups treated with the association of artesunate plus mefloquine had a lower histopathology index when compared with to the same doses of isolated artesunate (table 2). In the same way, as the group treated with isolated artesunate, the embryos that presented red blood cells reduction were the same embryos that was observed cell death and organs with irregular architecture.

In the group exposed to AS15MQ30, three of the five analyzed embryos showed anomalies (table 2). These embryos presented anemia, with general reduced concentration of red blood cells. Cell death was found at the central nervous system, mesenchyme surrounding aorta and mesenchyme of caudal region.

In the group exposed to AS40MQ80, three of the four analyzed embryos showed anomalies, and the histopathology index of these anomalies (3.1) was higher than the observed in the group treated with AS15 (0.5), but lower when compared with to the group treated with isolated AS40 (10.5) (table 2 and figure 4). Reduced concentration of red blood cells and some empty vessels were found. Focal necrosis was observed in the central nervous system, intermediate mesenchyme, splanchnic mesenchyme, somites, splanchnic mesenchyme and pharyngeal arches. General cell death areas were found in two embryos.

4 Discussion

The present study investigated the effect of the antimalarials agents artesunate and mefloquine, and their association, on pregnancy and embryonic development in rats. The results are consistent with literature data showing that artesunate impairs rat development. AS15 and AS40 administered on day 9 to 11 pc was markedly embryotoxic, with significant post-implantation losses and increased incidence of histological alterations.

The results of treatment with artesunate and mefloquine, isolated or in association did not indicate alteration in the body weight gain of dams, maternal progesterone and testosterone dosages and other signs of clinical toxicity, excluding a possible maternal toxicity. The levels of post implantation losses observed in this study with the treatment with AS40 (40%) were lower than the losses cited in the literature, when in the same dose, some studies reported 100% of post implantation losses.¹² This probably occurred because the euthanasia was performed just one day after the treatment, in the beginning of the alterations. Previous studies showed that embryoletality is the hallmark effect of artesunate developmental toxicity in rats and that the most critical period of artesunate treatment in rats is between the days 9 to 11 pc,^{12,15} these developmental effects were observed largely in the absence of any apparent maternal toxicity. The induction of embryoletality by artesunate has been reported in, at least, 3 species: rats, rabbits and monkeys.^{12,25}

The administration of mefloquine without artesunate did not cause embryo death. The embryos death observed with the association artesunate-mefloquine could be attributed to artesunate. The embryoletality was significant when artesunate was given alone or in combination with mefloquine, and the association

did not enhance the embryoletality. Although, some embryos exposed to isolated mefloquine presented hydrocephalus. Studies cited by Palmer and coworkers (1993) and Phillips-Howard (1996) demonstrated that mefloquine was teratogenic in animal at 5-20 times the recommended dosage for humans.^{19,26} The observed anomalies were domed cranium, hydrocephalus in rats, and cleft palate and skeletal anomalies in mice. In the present study, the litters were exposed to isolated MQ30 and MQ80, respectively 4 and 10 times the humans dosage.¹⁷ Currently, women of childbearing potential are advised to take contraceptive precautions up to three months after the last dose. It is recommended to use in pregnancy only if the expected benefit justifies the potential risk for the fetus.²¹ Studies on the use of mefloquine in prophylaxis during the second half of pregnancy have concluded that the drug is safe, but there are few data on the effects of fetal exposure to mefloquine given for the treatment of malaria during early gestation.^{20,21,27,28} In the present study, the hydrocephalus observed in a few embryos exposed to isolated mefloquine was not observed in the embryos exposed to the combination artesunate plus mefloquine.

The histological examination reveals normal tissue organization in all the control group embryos. The changes observed in the groups treated with artesunate are similar to patterns of anomalies seen in other studies where artesunate was administered orally in rats and also in monkeys.^{14,25,29} This pattern includes reduction, lack of deformed red blood cells in the vasculature, liver and heart architecture anomalies and areas with cell death. The histological effects of artesunate were significant when artesunate was given alone or in combination with mefloquine, however the association led to a decrease of the histopathology index when compared to isolated artesunate. The way that mefloquine could attenuate the

developmental toxic effects on artesunate is unclear. In principle, observed drug interactions may involve toxicokinetic, toxicodynamic or both factors.

After being absorbed, artesunate ester bond is hydrolyzed within minutes yielding DHA that is believed to be its main active metabolite against malaria parasites and also the proximate developmental toxicant compound.³⁰ A hypothesis has been advanced that the initial event in the developmental toxicity of artesunate and DHA is a depletion of primitive embryonic erythroblasts, which led to a prolonged, severe anemia.¹⁶ The initial observation of this anemia was the loss of red color from the blood vessels in the embryo, which was apparent by 6 h after a single administration of 17 mg/kg artesunate on day 11 pc. By 24 h after there was a marked reduction in primitive erythroblasts and, by 2 days after dosing, there was almost complete elimination of the primitive erythroblasts.¹⁶

In mammalian embryos an active erythropoietic activity is first detected in the yolk sac.⁶ It is generally accepted that hematopoietic stem cells are generated during embryonic development in the yolk sac and sequentially colonize the fetal liver, the spleen, and finally the bone marrow.³¹ The red blood cells produced by the yolk sac are nucleated and metabolically active, able to synthesize protein and prosthetic components (heme) of hemoglobin.²⁹ In the same way that the parasitized erythrocytes with plasmodium, primitive erythroblasts have high concentrations of heme and iron, and both have been proposed as activators and as targets of artemisinin derivatives.^{32,33} The primitive erythroblasts enter the embryonic circulation about day 10 of gestation in the rat, at the same time that the heart begins to beat.¹⁴ The primitive erythrocytes never reach the final enucleated stage in situ, and for this reason they have been called primitive.³¹

The marked depletion of embryonic erythroblasts after a single artesunate dose to rats on days 10 or 11 of gestation is due to the death of the primitive erythroblast population. Since, after day 10 of gestation, the primitive erythroblast population is self-sustaining, once extensively depleted, they cannot be replaced until definitive erythroblasts are introduced into the blood from the liver.⁶ Embryonic responses to acute anemia varied from complete recovery to malformation and death, depending on the extension of cell death.

Non-clinical and clinical studies on the safety of antimalarial drug combinations during pregnancy have seldom been performed. An exception was a study by Clark et al (2004)¹² on the developmental toxicity of a three drug combination consisting of chlorproguanil-dapsone and artesunate (1:1.25:2) in rats and rabbits. Data from the foregoing study showed no evidence of a potentiating effect of this combination compared to artesunate given separately, on the contrary, results presented in this paper suggested that the developmental toxicity of artesunate may be attenuated when co-administrated with mefloquine. There were no antagonistic interactions between artesunate and mefloquine in studies published on the efficacy and pharmacokinetics of these drugs when performed in non-pregnant subjects. However, during pregnancy, there might be changes on the pharmacokinetics of drugs, with modifications, mainly on the distribution and metabolism, even the artemisinin derivatives are enzymatic inducers of various CYP450 families. Moreover, the target of the toxic action of artemisinin derivatives is the fetal erythroblast,^{14,16,29} that is much more sensitive to artemisinins than the adult erythroblast.⁶ The protective action of mefloquine on the reproductive toxicity of artesunate may be taking place in cellular level, however to prove this hypothesis,

further studies on the mechanism of reproductive toxicity and toxicokinetics of this interaction are necessary.

In conclusion, the association artesunate plus mefloquine is effective and indispensable as antimalarial, but the exposure during gestation may induce post-implantation losses and malformations, mainly in early gestation. The embryoletality and the histological alterations were significant when artesunate was given alone or in combination with mefloquine. However, the results indicate a reduction of some developmental anomalies of artesunate associated with mefloquine at both evaluated doses. Due to malaria therapy dependence on the use of drug combinations containing artemisinins, and also to the decreased morbidity and mortality of malaria in pregnant women, mechanisms by which mefloquine and artesunate interact during gestation deserve to be further investigated.

Acknowledgments

The authors are grateful to FIOCRUZ/PDTIS for supplying the drugs.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding

This work was partially supported by CAPES, CNPq and FUNPAR.

Legends to figures

Figure 1. Red blood cells patterns from control (A; C and E) and AS40 (B; D and F) embryos on day 12 pc. (A) Control embryo with well-vascularized yolk sac (arrow); (B) embryo exposed *in utero* to AS40 with anemic yolk sac (arrow); (C and E) sagittal sections of well-developed livers from control group, red blood cells are spherical and nucleated (E – arrows) and the vasculature are full of cells (C - *); (D and F) sagittal sections of AS40 irregular architecture livers from embryos on day 12 pc, red blood cells are fewer in number (D - *) and some with abnormal shape (F – arrow).

Figure 2. Histological sagittal sections of hearts from control (A and C) and AS40 (B and D) embryos on day 12 pc. (A) well-developed heart; (B) heart with irregular architecture; (C) control heart with red blood cells (arrow); (D) heart with almost no red blood cells (arrow). a=atrium; v=ventricle.

Figure 3. Histological sagittal sections from control (A and C) and AS40 (B and D) embryos on day 12 pc. Control embryo showed well-organized tissues in pharyngeal arches (A) and somites (C). Embryo exposed *in utero* to artesunate has areas of cell death in the pharyngeal arches (B) and somites (D) (arrows).

Figure 4. Histopatology Index. (A) General histopatology index; (B) Index_{RBC} (index of red blood cells anomalies); Index_{CD} (index of cell death); Index_{IA} (index of organs irregular architecture). AS15=artesunate 15 mg/kg bwt/day; AS40=artesunate 40 mg/kg bwt/day; MQ30=mefloquine 30 mg/kg bwt/day; MQ80=mefloquine 80 mg/kg bwt/day; AS15 + MQ30= artesunate 15 mg/kg bwt/day plus mefloquine 30 mg/kg

bwt/day; AS40 + MQ80= artesunate 40 mg/kg bwt/day plus mefloquine 80 mg/kg bwt/day.

Figure 1

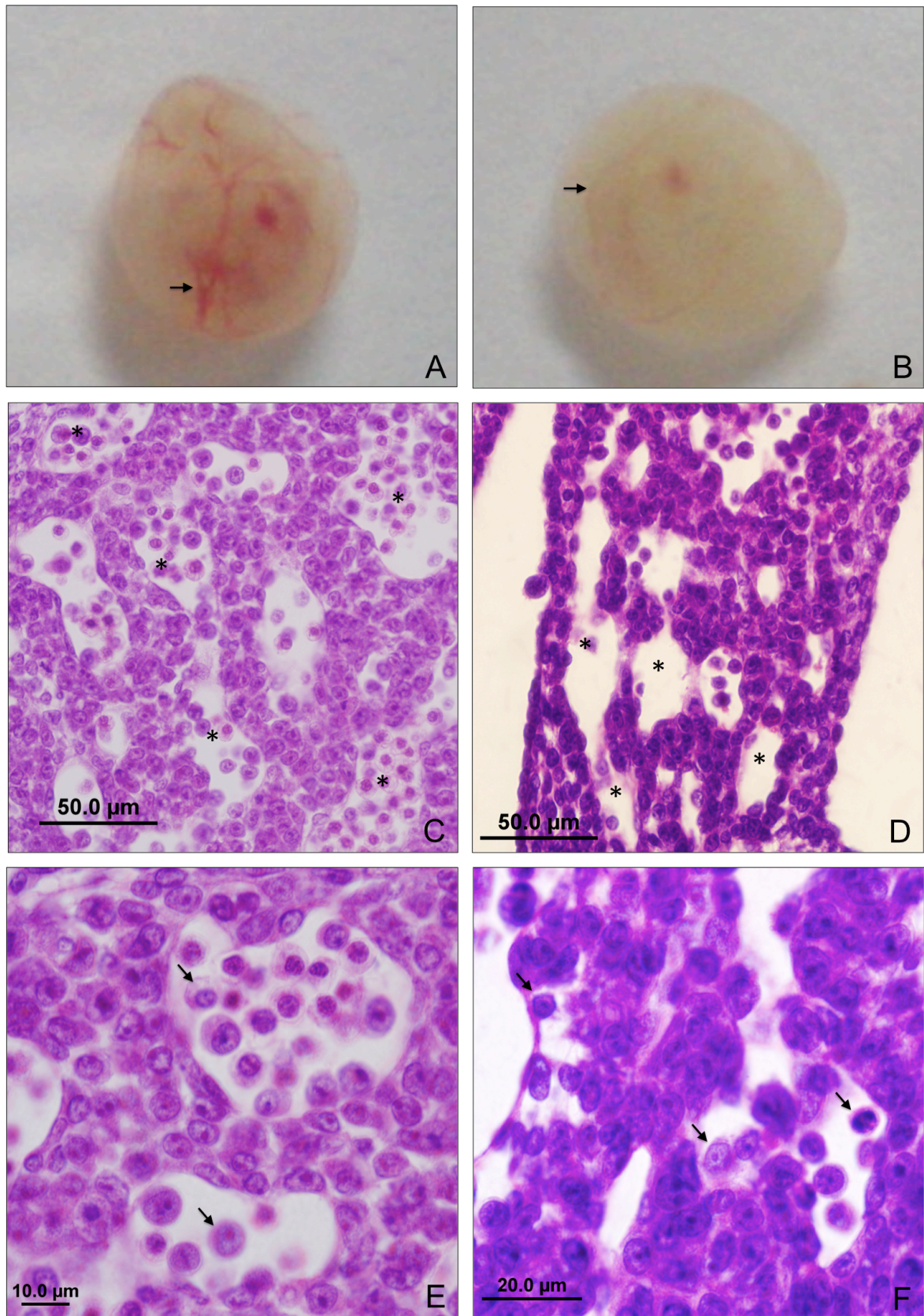


Figure 2

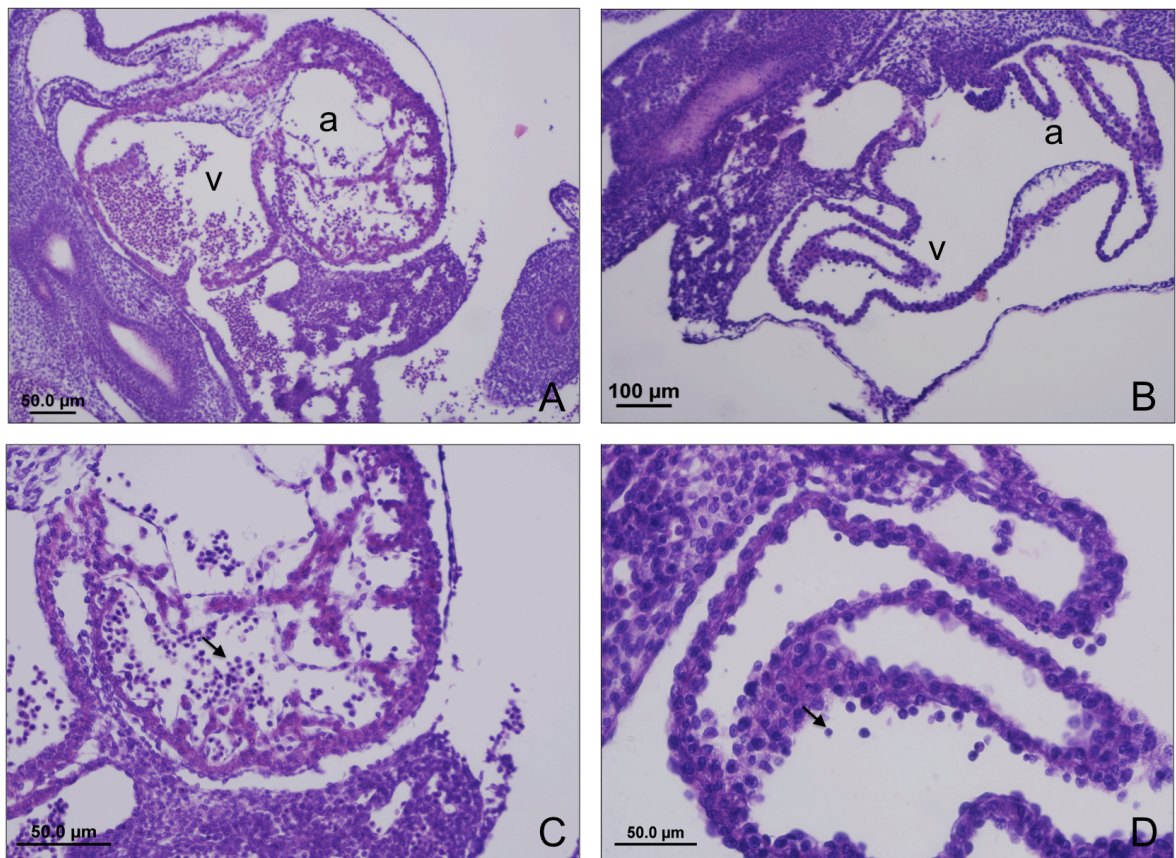


Figure 3

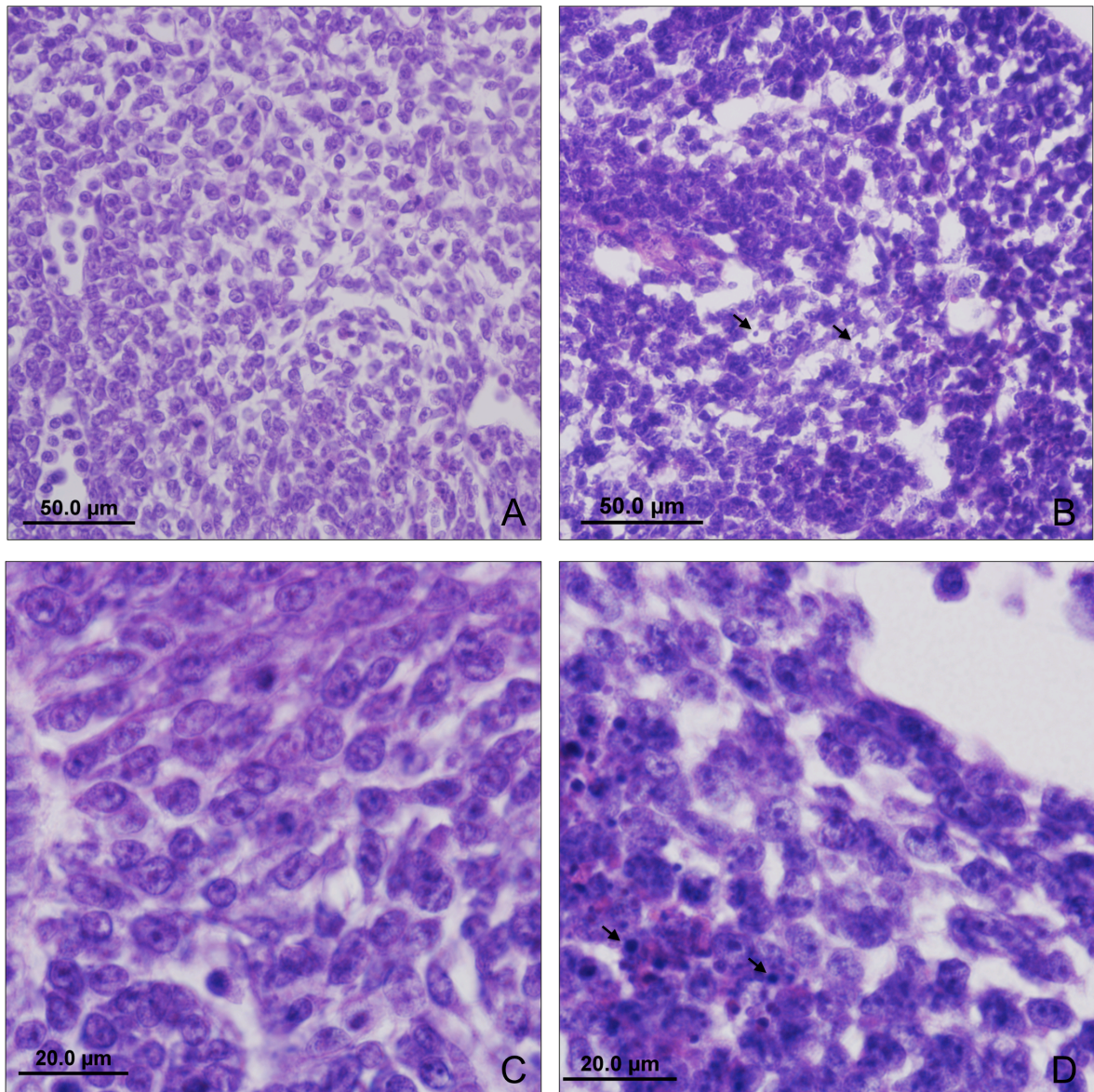
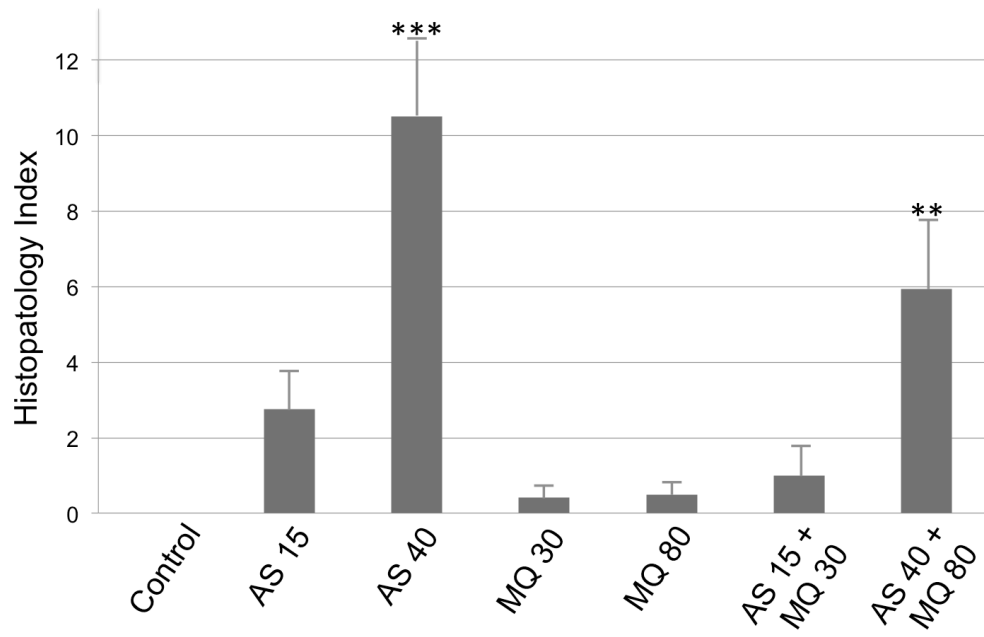


Figure 4

A



B

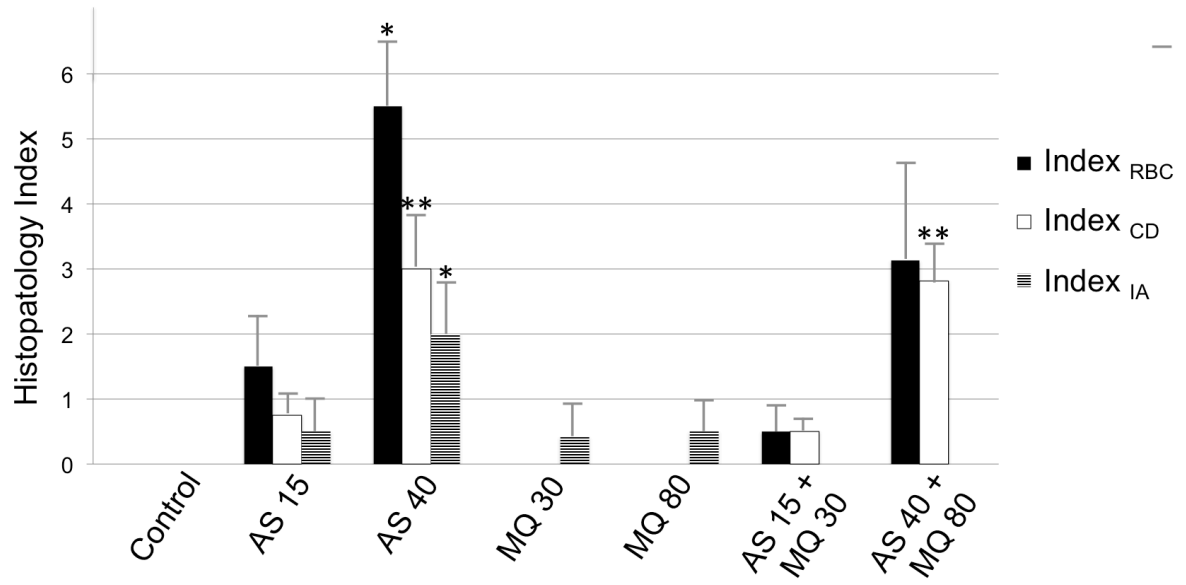


Table 1. Maternal and pregnancy data of dams treated orally with artesunate, mefloquine and artesunate/mefloquine association on gestational day 9-10 and results of cesarean sectioning on day 12 pc.

Treatment	Vehicle- controle	Artesunate		Mefloquine		Artesunate/Mefloquine	
		15 mg/kg	40 mg/kg	30 mg/kg	80 mg/kg	15/30 mg/kg	40/80 mg/kg
Treated females (N)	15	15	15	15	15	15	15
Pregnant females (N)	12	13	12	14	13	12	13
With viable embryos	12	12	11	14	13	12	11
With total embryonic resorption	0	1	1	0	0	0	2
Maternal weight (g)							
Day 0 pc	242.4 ± 9.1	238.3 ± 7.1	245.9 ± 9.3	243.5 ± 7	230.7 ± 7.2	225.8 ± 6.8	244.1 ± 8.7
Day 12 pc	275.4 ± 0.6	269.7 ± 9.5	272.8 ± 11.2	275.6 ± 7.3	260.2 ± 7.6	256.9 ± 5.5	264.6 ± 7.8
Relative maternal gain weight (%) ^a							
Day 9 pc	10.9 ± 1.5	9.4 ± 1	9.5 ± 1.4	10.3 ± 0.9	9.8 ± 1.2	12.2 ± 1.4	8 ± 0.8
Day 10 pc	11.7 ± 1.5	9.2 ± 1	10.1 ± 1.5	10.2 ± 1.2	11.1 ± 0.9	12 ± 2.2	8.8 ± 1
Day 11 pc	13 ± 1.6	11.4 ± 1.4	11.2 ± 1.3	11.6 ± 1.1	11.7 ± 0.9	13.8 ± 1.5	9.4 ± 1.3
Day 12 pc	13.9 ± 1.5	13 ± 1.7	10.8 ± 1.2	13.4 ± 1.2	13 ± 1.3	14.2 ± 1.7	8.9 ± 1.7
Uterus weight with embryos							
Absolute (g)	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.4	2.8 ± 0.3	3.4 ± 0.8	3 ± 0.3	3.2 ± 0.3	2.7 ± 0.3
Relative (%)	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1 ± 0.1
Uterus weight (g)/implantations	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.36 ± 0.03	0.33 ± 0.01	0.3 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.3 ± 0.01
Mean litter values							
Implantations	10.2 ± 0.8	10.7 ± 1	8.9 ± 0.9	10.6 ± 0.8	10.1 ± 1	10.5 ± 1.1	8.5 ± 1
Viable embryos	9.6 ± 0.7	7.2 ± 0.9	5.9 ± 1	9.7 ± 0.9	9.2 ± 0.9	7.8 ± 1	5.8 ± 1
Viable embryos (%)	95.4 ± 1.6	69.7 ± 6.8**	59.8 ± 9.2***	91 ± 2.2	91.6 ± 2	70.9 ± 7.2**	66.9 ± 7.8***
Post implantation loss (%)	4.6 ± 1.4	30.3 ± 6.8**	40.2 ± 9.2***	9 ± 2	8.4 ± 2	29.1 ± 7.2**	33.1 ± 7.8***
Anemic yolk sac (%)	0	38.4 ± 7.1**	77.28 ± 5.8***	0	0	37.2 ± 8.1**	46.2 ± 9.8***

Maternal plasmatic hormone levels ^b							
Progesterone (ng/mL)	94.2 ± 6.7	92.6 ± 8	98.7 ± 7.4	97.6 ± 6.1	100.9 ± 5.8	95.6 ± 6.6	86.5 ± 7.5
Testosterone (ng/mL)	0.71 ± 0.08	0.70 ± 0.13	0.76 ± 0.14	0.66 ± 0.07	0.58 ± 0.07	0.72 ± 0.08	0.63 ± 0.07

^a % of maternal weight gain compared to Day 0 pc. ^b on day 12 pc. Values represent mean ± S.E.M. ** p≤0.01/**p≤0.001.

Table 2. Histological anomalies in the day 12 pc embryos following 3 days of oral doses of artesunate, mefloquine and artesunate/mefloquine association on days 9-11 pc.

Treatment	Vehicle-Control	Artesunate		Mefloquine		Artesunate/Mefloquine	
		15 mg/kg	40 mg/kg	30 mg/kg	80 mg/kg	15/30 mg/kg	40/80 mg/kg
Embryos evaluated (N)	6	5	5	5	5	5	5
Red blood cell histopathology (%) ^a	0	40	80	0	0	20	50
Empty vessels	0	20	80	0	0	0	50
General reduced concentration	0	40	80	0	0	20	75
Abnormal cells	0	0	40	0	0	0	0
Pale cells	0	0	20	0	0	0	0
Cell death histopathology (%) ^a	0	20	80	0	0	20	75
General cell death areas	0	20	80	0	0	0	25
Central nervous system	0	20	60	0	0	20	50
Intermediate mesenchyme	0	0	20	0	0	0	25
Mesenchyme surrounding aorta	0	0	20	0	0	0	0
Mesenchyme of caudal region	0	0	0	0	0	20	0
Pharyngeal arches	0	20	20	0	0	0	25
Somites	0	0	20	0	0	0	50
Splanchnic mesenchyme and gut	0	0	20	0	0	0	50

Organ irregular architecture histopatology (%) ^a	0	20	40	20	20	0	0
Heart	0	0	40	0	0	0	0
Liver	0	0	20	0	0	0	0
Splanchnic mesenchyme and gut	0	20	20	0	0	0	0
Hydrocephalus	0	0	0	20	20	0	0

^a Data expressed as percentage (%) of embryos with the anomaly per group.

References

1. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2005;434:214-7.
2. AlKadi HO. Antimalarial drug toxicity: a review. *Chemotherapy* 2007;53:385-91.
3. White NJ. Preventing antimalarial drug resistance through combinations. *Drug Resist Updat* 1998;1:3-9.
4. Deen JL, von Seidlein L. Antimalarial use during pregnancy and its effect on birthweight. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002;96:573-4.
5. Meshnick SR, Taylor TE, Kamchonwongpaisan S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol Rev* 1996;60:301-15.
6. Clark RL. Embryotoxicity of the artemisinin antimalarials and potential consequences for use in women in the first trimester. *Reprod Toxicol* 2009;28:285-96.
7. Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Declining artesunate-mefloquine efficacy against *falciparum* malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerg Infect Dis* 2008;14:716-9.
8. Lim P, Alker AP, Khim N, et al. Pfm-dr1 copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in *falciparum* malaria in Cambodia. *Malar J* 2009;8:11.
9. Rogers WO, Sem R, Tero T, et al. Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia. *Malar J* 2009;8:10.

10. World Health Organization Guidelines for the treatment of malaria. <http://www.who.int/malaria/docs/TreatmentGuidelines2006.pdf>, 2006. (Accessed 2012, at <http://www.who.int/malaria/docs/TreatmentGuidelines2006.pdf>.)
11. Chen LJ, Wang MY, Sun WK, Liu MZ. [Embryotoxicity and teratogenicity studies on artemether in mice, rats and rabbits]. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1984;5:118-22.
12. Clark RL, White TE, S AC, Gaunt I, Winstanley P, Ward SA. Developmental toxicity of artesunate and an artesunate combination in the rat and rabbit. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2004;71:380-94.
13. Boareto AC, Muller JC, Bufalo AC, et al. Toxicity of artemisinin [*Artemisia annua* L.] in two different periods of pregnancy in Wistar rats. *Reprod Toxicol* 2008;25:239-46.
14. Longo M, Zanoncelli S, Torre PD, et al. In vivo and *in vitro* investigations of the effects of the antimalarial drug dihydroartemisinin (DHA) on rat embryos. *Reprod Toxicol* 2006;22:797-810.
15. White TE, Clark RL. Sensitive periods for developmental toxicity of orally administered artesunate in the rat. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2008;83:407-17. NEVILL AM. The need to scale for differences in body size and mass: an explanation of Kleiber's 0.75 mass exponent. *J Appl Physiol* 1994;77(6):2870-3.
16. White TE, Bushdid PB, Ritter S, Laffan SB, Clark RL. Artesunate-induced depletion of embryonic erythroblasts precedes embryoletality and teratogenicity in vivo. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2006;77:413-29.
17. WHO. Guidelines for the treatment of malaria. In. 2 ed. Geneva: World Health Organization; 2010.

18. Nosten F, Hien TT, White NJ. Use of artemisinin derivatives for the control of malaria. *Med Trop (Mars)* 1998;58:45-9.
19. Palmer KJ, Holliday SM, Brogden RN. Mefloquine. A review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 1993;45:430-75.
20. Ward SA, Sevene EJ, Hastings IM, Nosten F, McGready R. Antimalarial drugs and pregnancy: safety, pharmacokinetics, and pharmacovigilance. *Lancet Infect Dis* 2007;7:136-44.
21. Vanhauwere B, Maradit H, Kerr L. Post-marketing surveillance of prophylactic mefloquine (Lariam) use in pregnancy. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58:17-21.
22. WHO. Assessment of the safety of artemisinin compounds in pregnancy. In. Geneva: World Health Organization; 2006.
23. Nevill AM. The need to scale for differences in body size and mass: an explanation of Kleiber's 0.75 mass exponent. *J Appl Physiol* 1994;77:2870-3.
24. Bernet DS, H.; Meier, W.; Burkhardt-Holm P.; Wahli, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases* 1999;22:22-34.
25. Clark RL, Arima A, Makori N, et al. Artesunate: developmental toxicity and toxicokinetics in monkeys. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2008;83:418-34.
26. Phillips-Howard PA, Wood D. The safety of antimalarial drugs in pregnancy. *Drug Saf* 1996;14:131-45.
27. Nosten F, ter Kuile F, Maelankiri L, et al. Mefloquine prophylaxis prevents malaria during pregnancy: a double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis* 1994;169:595-603.
28. Steketee RW, Wirima JJ, Slutsker L, Khoromana CO, Heymann DL, Breman JG. Malaria treatment and prevention in pregnancy: indications for use and adverse

events associated with use of chloroquine or mefloquine. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55:50-6.

29. Longo M, Zanoncelli S, Manera D, et al. Effects of the antimalarial drug dihydroartemisinin (DHA) on rat embryos in vitro. *Reprod Toxicol* 2006;21:83-93.

30. Burk O, Arnold KA, Nussler AK, et al. Antimalarial artemisinin drugs induce cytochrome P450 and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol* 2005;67:1954-65.

31. Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol* 2007;25:745-85.

32. Olliaro PL, Haynes RK, Meunier B, Yuthavong Y. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. *Trends Parasitol* 2001;17:122-6.

33. Parapini S, Basilico N, Mondani M, Olliaro P, Taramelli D, Monti D. Evidence that haem iron in the malaria parasite is not needed for the antimalarial effects of artemisinin. *FEBS Lett* 2004;575:91-4.

5.5.1 Material complementar

5.5.1.1 Tabelas e figuras complementares

TABELA 5. MASSA DOS ÓRGÃOS DAS PROGENITORAS, NO DIA GESTACIONAL 12, APÓS TRATAMENTO COM ARTESUNATO, MEFLOQUINA E ASSOCIAÇÃO ARTESUNATO/MEFLOQUINA NOS DIA 9-11 DE GESTAÇÃO

Tratamento	Controle	Artesunato		Mefloquina		Artesunato/Mefloquina	
		15 mg/kg	40 mg/kg	30 mg/kg	80 mg/kg	15/30 mg/kg	40/80 mg/kg
Fêmeas tratadas (N)	15	15	15	15	15	15	15
Fêmeas prenhas (N)	12	13	12	14	13	12	13
Com embriões viáveis	12	12	11	14	13	12	11
Com perda total de ninhada	0	1	1	0	0	0	2
Massa materna (g)							
Dia gestacional 12	275,4 ± 0,6	269,7 ± 9,5	272,8 ± 11,2	275,6 ± 7,3	260,2 ± 7,6	256,9 ± 5,5	264,6 ± 7,8
Massa absoluta dos órgãos (g)							
Ovarios	0,049 ± 0,002	0,046 ± 0,003	0,042 ± 0,002	0,049 ± 0,002	0,044 ± 0,003	0,048 ± 0,002	0,048 ± 0,003
Fígado	12,5 ± 0,6	11,3 ± 0,6	11,1 ± 0,4	12,1 ± 0,4	11,1 ± 0,05	11,4 ± 0,5	11,4 ± 0,4
Rins	0,822 ± 0,03	0,813 ± 0,03	0,838 ± 0,03	0,869 ± 0,03	0,819 ± 0,03	0,827 ± 0,03	0,812 ± 0,02
Adrenais	0,023 ± 0,001	0,022 ± 0,002	0,022 ± 0,001	0,023 ± 0,001	0,023 ± 0,001	0,023 ± 0,001	0,023 ± 0,001
Baço	1,12 ± 0,17	0,751 ± 0,06	0,743 ± 0,06	0,989 ± 0,073	0,779 ± 0,067	0,905 ± 0,056	0,788 ± 0,033
Útero	3,19 ± 0,23	2,83 ± 0,3	2,8 ± 0,27	3,43 ± 0,012	2,98 ± 0,305	3,16 ± 0,32	2,69 ± 0,10
Massa do útero (g)/implantes	0,32 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,36 ± 0,03	0,33 ± 0,01	0,3 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,3 ± 0,01
Massa relativa dos órgãos (%)^a							
Ovarios	0,017 ± 0,001	0,017 ± 0,001	0,016 ± 0,001	0,018 ± 0,001	0,017 ± 0,001	0,019 ± 0,001	0,018 ± 0,001
Fígado	4,54 ± 0,19	4,17 ± 0,16	4,12 ± 0,18	4,41 ± 0,13	4,27 ± 0,18	4,47 ± 0,25	4,32 ± 0,17
Rins	0,300 ± 0,008	0,304 ± 0,01	0,309 ± 0,07	0,316 ± 0,07	0,315 ± 0,007	0,323 ± 0,012	0,310 ± 0,009
Adrenais	0,009 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001
Baço	0,413 ± 0,063	0,280 ± 0,015	0,273 ± 0,019	0,367 ± 0,036	0,302 ± 0,028	0,355 ± 0,026	0,301 ± 0,016
Útero	1,17 ± 0,08	1,21 ± 0,14	1,06 ± 0,1	1,25 ± 0,1	1,13 ± 0,09	1,22 ± 0,12	1,02 ± 0,1

^a Massa relativa: [(massa do órgão/massa corporal) x 100]. Os resultados expressam média ± erro padrão.

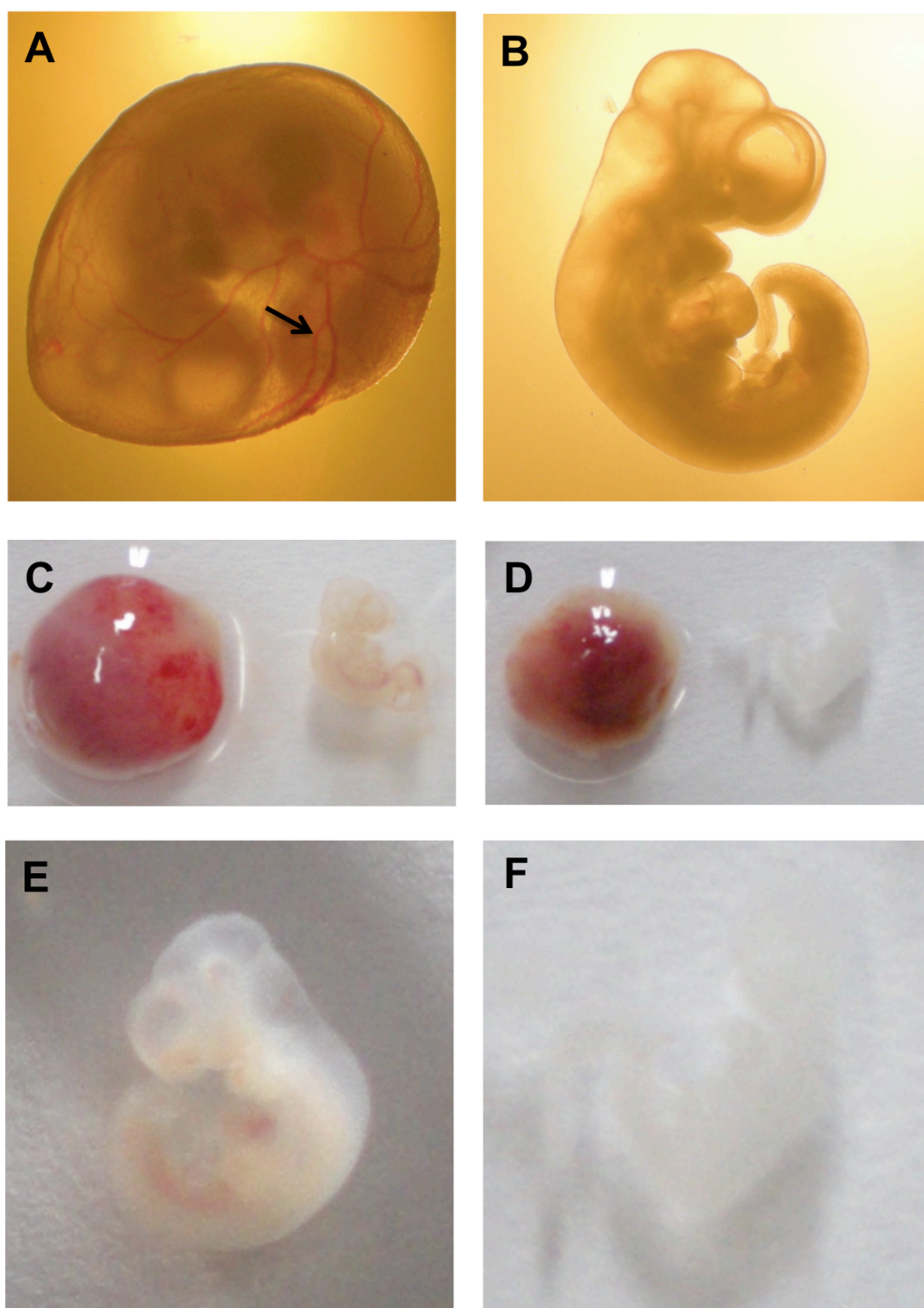


FIGURA 10: AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA VIABILIDADE EMBRIONÁRIA E VASCULARIZAÇÃO DA VESÍCULA VITELÍNICA. A: embrião controle com vesícula vitelínica bem vascularizada (seta) observado em estereomicroscópio; B embrião viável observado através de estereomicroscópio; C: vesícula vitelínica e embrião viáveis; D: vesícula vitelínica e embrião em reabsorção; E: embrião do grupo controle; F: embrião exposto a 40 mg/kg/dia de artesunato nos dias gestacionais 9-11.

6. DISCUSSÃO GERAL

A presente tese investigou os efeitos dos antimaláricos artesunato e mefloquina, e de sua associação, durante o desenvolvimento embrionário e fetal em ratos.

Os dois estudos que constituem esta tese formam uma sequência de experimentos que se completam. Em ambos os estudos as progenitoras foram expostas ao tratamento nos dias 9 a 11 de prenhez, considerado o período de maior toxicidade do artesunato durante a gestação em ratos (CLARK *et al.*, 2004). Em uma primeira etapa as progenitoras foram eutanasiadas no dia 20 de gestação, onde foram avaliadas a toxicidade materna, a viabilidade das ninhadas e as alterações teratológicas nos fetos. No experimento subsequente, as progenitoras foram eutanasiadas no dia 12 de gestação para possibilitar, através de análises histopatológicas, a avaliação do início da ação tóxica que induziu as malformações e mortes observadas no primeiro estudo, além da avaliação da toxicidade materna.

O tratamento foi realizado a partir do nono dia de prenhez, evitando qualquer efeito sobre a implantação do ovo no útero, que em ratos acontece cinco a seis dias após a fecundação (BERNARDI, 2002).

6.1 Toxicidade materna

Para avaliarmos a toxicidade pré-natal induzida por drogas, muitos fatores devem ser considerados, como o período gestacional da exposição, o tempo de exposição, as doses administradas, entre outros. Variáveis como mortalidade materna, redução no ganho de massa corporal das progenitoras durante o tratamento, sinais clínicos de toxicidade materna e alterações nos níveis hormonais plasmáticos são utilizados para avaliar a ação do medicamento sobre a gestação (US-EPA, 1996). Os resultados do tratamento com o artesunato 15 mg/kg/dia, isolado ou em associação com a mefloquina, nos dois experimentos realizados, não indicaram alterações no ganho de massa corporal das progenitoras. A administração de artesunato 40 mg/kg/dia, tanto isolado como em associação com a artemisinina, reduziu significativamente o ganho de massa corporal das progenitoras a partir do dia 15 de gestação, sem outro sinal clínico de toxicidade materna. Essa redução no ganho de massa corporal é, provavelmente, consequência da grande letalidade

embrionária e fetal nesses grupos. A variação no ganho de massa corporal durante todo o período gestacional, que está reduzida nesse grupo, perde a significância estatística quando é subtraída a massa do útero gravídico. Não foram observadas alterações significativas no ganho de massa corporal entre os grupos no segundo estudo porque as progenitoras foram eutanasiadas no dia gestacional 12, antes de iniciar o declínio no gráfico de ganho de massa.

Não houve alterações significativas no ganho de massa corporal durante a prenhez nos grupos tratados com a mefloquina isolada na dose de 30 mg/kg/dia, nos dois estudos. No entanto, no grupo tratado com mefloquina 80 mg/kg/dia, observou-se uma redução no ganho de massa corporal logo após o tratamento. Esta redução deixou de ser observada no decorrer da gestação, indicando um possível efeito de toxicidade materna da mefloquina durante o tratamento, que desapareceu após a retirada do medicamento e não atingiu o desenvolvimento da prole. Estudos têm relatado efeitos adversos sobre o sistema nervoso central após a administração de mefloquina, como convulsões, alucinações, tontura, dores de cabeça e insônia (ALKADI, 2007). A dose de 80 mg/kg/dia de mefloquina é equivalente a 10 vezes a dose recomendada pela OMS para uso em humanos (WHO, 2011), e a redução no ganho de massa corporal observada nesse grupo pode ser consequência da dose administrada. Não foram observadas alterações no ganho de massa corporal das progenitoras tratadas com mefloquina no segundo experimento, provavelmente devido ao fato dos animais terem sido eutanasiados apenas 24 horas após o término do tratamento.

6.2 Letalidade embrionária e fetal

Estudos anteriores, realizados em ratos, coelhos, hamster e porquinhos da Índia, demonstram que o principal efeito adverso induzido pelos derivados da artemisinina na gestação é a marcante letalidade embrionária dose dependente (BOARETO *et al.*, 2008; CLARK, 2009; CLARK *et al.*, 2004; LI, 1988; XU; ZHANG, 1996). Esses efeitos são observados na ausência de toxicidade materna aparente. Clark *et al.* (2004) demonstraram que o período mais crítico de exposição ao artesunato, em ratos, é entre os dias 9 a 11 de gestação e que os ratos são mais sensíveis à embriofetividade induzida pelo artesunato do que os coelhos. Em outro estudo, Clark *et al.* (2008b) demonstraram que o artesunato também é capaz de

causar embrioletalidade em macacos, quando administrado por via oral nas doses de 12 e 30 mg/kg/dia por mais de 12 dias, a partir do dia 20 de gestação. Este efeito não foi observado quando o artesunato foi administrado por 3 a 7 dias na dose de 12 mg/kg/dia. Com isso, a indução de embrioletalidade induzida pelo artesunato já foi relatada em, pelo menos, cinco espécies. O principal metabólito ativo de diversos derivados da artemisinina, incluindo o artesunato, é a DHA. Um estudo comparativo realizado com derivados da artemisinina estruturalmente relacionados (DHA, artemeter, arteeter e artesunato) demonstrou que todas as drogas avaliadas tiveram efeito semelhante sobre a mortalidade embrionária e que a DHA é, provavelmente, o principal agente responsável por esse efeito (CLARK *et al.*, 2008b). Estudos realizados com a artemisinina (*qinghaosu*), extraída da *Artemisia annua*, que não é extensivamente metabolizada em DHA, também demonstraram aumento de perdas pós-implantação dose dependente, com perda total das ninhadas nas maiores doses, dando suporte à hipótese de que todo o grupo farmacológico da artemisinina e seus derivados é embrioletal (BOARETO *et al.*, 2008).

No presente estudo, quando o artesunato foi administrado nas doses de 15 e 40 mg/kg/dia causou, respectivamente, 48 e 100% de letalidade fetal no primeiro experimento e 30 e 40% de perdas pós-implantação no segundo experimento. Esses resultados corroboram com os dados publicados anteriormente na literatura, apesar dos dados de perdas pós-implantação do segundo estudo estarem abaixo do esperado para as doses administradas de artesunato. Uma explicação para os baixos índices de perda pós-implantação no segundo estudo é a avaliação ter sido realizada pouco tempo após o tratamento. Alguns dos embriões que foram considerados viáveis no momento da cesariana apresentaram, nas análises histopatológicas, alterações teciduais incompatíveis com a sua sobrevivência, como perda da arquitetura normal do coração e fígado e depleção quase total das células vermelhas sanguíneas. Outra possibilidade é que, no período avaliado (dia gestacional 12) estão ocorrendo as alterações que, posteriormente, levarão este feto à morte.

No estudo aqui apresentado, a administração de mefloquina sem o artesunato não causou aumento significativo na morte de embriões e fetos. No entanto, em uma única progenitora no grupo tratado com 80 mg/kg/dia de mefloquina, no experimento 1, houve perda total da ninhada. Estudos clínicos têm demonstrado que a mefloquina, quando administrada durante o período gestacional, aumenta a

incidência de natimortos (MCGREADY *et al.*, 2000; NOSTEN *et al.*, 1999). A perda total de ninhada observada pode ser consequência desse efeito da mefloquina sobre a gestação. A embrioletalidade e outros sinais tóxicos no desenvolvimento embrionário observados com a administração da associação artesunato-mefloquina pode ser atribuída ao artesunato. O aumento na letalidade foi significativo quando o artesunato foi administrado isoladamente ou em associação com a mefloquina, no entanto, os resultados indicam uma redução nas perdas pós-implantação quando a mefloquina foi associada ao artesunato, em ambas as doses, no primeiro experimento, indicando um possível efeito protetor quando a mefloquina é adicionada ao artesunato. No experimento realizado com os embriões (dia gestacional 12), não foi observada alterações na letalidade embrionária induzida pelo artesunato com a adição da mefloquina.

6.3 Alterações estruturais/morfológicas embrionárias e fetais

As alterações observadas nos resultados de teratologia visceral estiveram restritos a poucas alterações na massa do fígado e pulmão, e somente nos animais tratados com artesunato 15 mg/kg/dia e na associação de artesunato 40 mg/kg/dia com mefloquina 80 mg/kg/dia. Estudos limitados sobre a teratogenicidade dos derivados da artemisinina, publicados antes de 2004, não mostraram anomalias na teratologia visceral de fetos avaliados (CLARK, 2009). No entanto, trabalhos mais recentes, com artesunato administrado por via oral em ratos, demonstraram um padrão de malformações cardiovasculares (defeitos no septo ventricular e defeitos em diversos vasos) (CLARK *et al.*, 2008a; CLARK *et al.*, 2004). No estudo aqui apresentado, as malformações cardiovasculares foram examinadas através da técnica de dissecação de Staples (1974) e nos estudos teratológicos onde foram observadas alterações cardiovasculares, o coração foi avaliado através da técnica adaptada por Solomon *et al.*, (1997), que é mais detalhada. Outro órgão, com registros na literatura de alterações teratológicas, é o fígado embrionário exposto ao artesunato. Anomalias na forma e tamanho dos lobos hepáticos foram observadas com a administração de quatro derivados da artemisinina (artesunato, DHA, artemeter e arteeter) quando administrados em dose única no dia 10 de gestação (CLARK *et al.*, 2008a).

Apesar do estudo teratológico apresentado nessa tese não detectar anormalidades no fígado e no coração, nos estudos histopatológicos estes órgãos foram amplamente afetados, tanto com a administração de artesunato isolado, quando com a associação artesunato-mefloquina. Os resultados encontrados nas análises histopatológicas dos grupos tratados com artesunato são semelhantes às anormalidades observadas em outros estudos onde o artesunato foi administrado por via oral em ratos e também em macacos (CLARK *et al.*, 2008b; LONGO *et al.*, 2006a; LONGO *et al.*, 2006b). Estas anormalidades incluem redução ou depleção de eritroblastos embrionários na vasculatura; alterações de forma nos eritroblastos; fígado e coração com arquitetura alterada; e diversas áreas com morte celular, como: sistema nervoso central, arcos faríngeos, somitos e mesênquimas esplâncnico, intermediário e ao redor da aorta. Apesar dos efeitos do artesunato sobre os tecidos embrionários terem sido observados tanto com o artesunato administrado isoladamente como em associação com a mefloquina, os resultados da associação desses antimaláricos indicam uma redução nas malformações quando comparados ao artesunato isolado.

As análises histológicas dos embriões expostos ao veículo controle revelaram organização tecidual normal em todos os embriões. Nos embriões expostos à mefloquina isoladamente, não foram observadas as alterações sobre as células vermelhas embrionárias, áreas de morte celular e malformação estrutural no fígado e coração observados com a administração de artesunato. No entanto, alguns embriões expostos à mefloquina apresentaram hidrocefalia. Estudos citados por Palmer *et al.* (1993) e Phillips-Howard (1996) demonstraram que a mefloquina é teratogênica em animais em doses 5 a 20 vezes maiores que a dose recomendada para humanos. As anomalias observadas foram crânio abaulado e hidrocefalia em ratos e fenda palatina e anomalias esquelética em camundongos. No presente estudo, as ninhadas foram expostas à mefloquina isolada nas doses de 30 e 80 mg/kg/dia, respectivamente 4 e 10 vezes a dose recomendada para humanos (WHO, 2010). Atualmente, mulheres em idade fértil são aconselhadas a utilizar contraceptivo oral por três meses após a última dose de mefloquina. O uso na gestação é recomendado somente quando o benefício esperado justifica o potencial risco para o feto (SCHLAGENHAUF *et al.*, 2012). Estudos sobre o uso de mefloquina como profilaxia antimalárica durante o segundo e terceiro trimestre de gestação indicam que a droga é segura, porém existem poucos dados sobre a

segurança da mefloquina no primeiro trimestre de gestação (NOSTEN *et al.*, 1994; STEKETEE *et al.*, 1996; VANHAUWERE *et al.*, 1998; WARD *et al.*, 2007). No presente estudo, os casos de hidrocefalia foram observados em poucos embriões expostos à mefloquina isolada e somente no segundo estudo.

A incidência de defeitos esqueléticos foi relativamente baixa, e algumas alterações foram observadas nas ninhadas expostas ao grupo controle. No entanto, os resultados observados são similares ao padrão de malformações relatado em outros estudos, onde o artesunato foi administrado por via oral em ratos (CLARK *et al.*, 2008a; CLARK *et al.*, 2004). Esse padrão consiste em uma síndrome de defeitos esqueléticos que inclui malformações nas costelas e ossos longos, e ossificação incompleta das esternébras e ossos pélvicos. Em macacos não foram observadas malformações ósseas relacionadas ao tratamento com artesunato, mas estudos histológicos sugerem que os eritroblastos primitivos do embrião de macaco são susceptíveis ao artesunato da mesma maneira que o embrião de rato (CLARK *et al.*, 2008a). O artesunato é muito mais embriotal do que teratogênico, somente baixa incidência de malformações esqueléticas podem ser induzidas, e nas mesmas doses onde é observada letalidade embrionária. No grupo tratado com artesunato 40 mg/kg/dia houve 100% de perda fetal, e no grupo tratado com a associação artesunato 40 mg/kg/dia com mefloquina 80 mg/kg/dia apenas quatro ninhadas tiveram fetos vivos, e esses fetos não apresentaram muitas alterações.

As ninhadas expostas *in utero* ao artesunato isolado e em associação apresentaram atraso na ossificação em relação ao grupo controle, mesmo com o grupo controle apresentando grande incidência de atraso na ossificação devido ao dia escolhido para a cesariana (dia gestacional 20). Os fetos tratados com artesunato isolado foram os mais afetados. Atrasos na ossificação são indicadores típicos de atraso no desenvolvimento (LEVINE; PARKER, 1991), corroborando com os dados aqui expostos de redução de massa corporal somente no grupo mais afetados na ossificação, o artesunato 15 mg/kg/dia. Os efeitos esqueléticos da exposição dos embriões ao artesunato foram significativos quando este foi administrado isolado ou em associação com a mefloquina, no entanto, a exposição à associação resultou em um decréscimo nas malformações quando comparadas ao artesunato isolado. O grupo exposto à mefloquina isolada não induziu malformações relevantes, com isso a toxicidade fetal observada com a associação artesunato-mefloquina pode ser atribuída ao artesunato. No grupo tratado com a maior dose de

artesanato isolado, não houve fetos vivos, e no grupo tratado com a maior dose da associação artesunato-mefloquina não foram observados os defeitos padrão da exposição ao artesunato sobre os ossos, provavelmente devido ao fato dos fetos mais afetados não terem sobrevivido até o final do experimento e somente as quatro ninhadas sobreviventes não serem suficientes para uma análise estatística confiável.

O mecanismo proposto na literatura para a embriotoxicidade dos derivados da artemisinina, incluindo as perdas embrio-fetais e as alterações cardíacas, hepáticas e esqueléticas, é a morte dos eritroblastos primitivos embrionários. O evento primário observado em embriões de ratos expostos ao artesunato e à DHA é a depleção de eritroblastos embrionários, que leva a uma severa e prolongada anemia (LONGO *et al.*, 2006a; LONGO *et al.*, 2006b; WHITE *et al.*, 2006). A observação inicial dessa anemia é a perda da coloração vermelha dos vasos do embrião, que é aparente em 6 horas após a administração de 17 mg/kg de artesunato no dia 11 de gestação (WHITE *et al.*, 2006). 24 horas após a administração há uma redução marcante nos eritroblastos primitivos e, 2 dias após a exposição, observa-se uma quase completa eliminação dos eritroblastos primitivos.

A anemia persistente que ocorre após a exposição a uma única dose do artesunato, em períodos mais sensíveis da gestação, é relacionada com o mecanismo de hematopoiese embrionário. Em embriões de mamíferos, a atividade eritropoiética é detectada inicialmente na vesícula vitelínica nos dias 7-7,5 de gestação em camundongos (PALIS; YODER, 2001) que corresponde aos dias 8,5-9 de gestação nos ratos (CLARK, 2009). As células hematopoiéticas são geradas durante o desenvolvimento embrionário e sequencialmente colonizadas no fígado, baço e, finalmente, medula óssea fetais (CUMANO; GODIN, 2007). As células vermelhas produzidas pela hematopoiese na vesícula vitelínica nos dias 9 a 14 de gestação em ratos são nucleadas e metabolicamente ativas, capazes de sintetizar proteína e componentes prostéticos (heme) da hemoglobina (LONGO *et al.*, 2006b). Da mesma maneira que os eritroblastos parasitados com o plasmódio causador da malária, os eritroblastos primitivos possuem grande concentração ferro e heme, que tem sido propostos tanto como ativadores, quanto como alvos dos derivados da artemisinina (OLLIARO *et al.*, 2001; PARAPINI *et al.*, 2004). Os eritroblastos definitivos começam a entrar na circulação a partir do dia 13 de gestação em ratos. Eles são formados a partir de células precursoras hematopoiéticas que se originam na vesícula vitelínica e migram para o fígado (PALIS; YODER, 2001; TAVASSOLI,

1991). Na maioria dos trabalhos com tratamento com estas drogas após o dia 14 de gestação, em ratos, quando o fígado, baço e medula óssea assumem o controle da hematopoiese e as células sanguíneas vermelhas nucleadas são substituídas por anucleadas, não são observadas alterações morfológicas nos fetos (CLARK *et al.*, 2004). Os eritroblastos primitivos entram na circulação embrionária por volta do dia 10 de gestação em ratos, aproximadamente ao mesmo tempo em que o coração começa a bater (TAVASSOLI, 1991). A marcante depleção dos eritroblastos embrionários observada após administração de artesunato nos dia 10 e 11 de gestação, dias de maior toxicidade dessa droga, é causada pela morte desses eritroblastos. Após o dia 10 de gestação, a população de eritroblastos primitivos é autossustentada (PALIS; YODER, 2001; TAVASSOLI, 1991), e uma vez reduzida extensivamente, não consegue ser reposta até que os eritroblastos definitivos sejam introduzidos no sangue a partir do fígado.

Nas avaliações histopatológicas realizadas para esta tese, observou-se uma relação direta entre a redução dos eritroblastos primitivos embrionários e a presença de áreas de morte celular. Os embriões que apresentaram maior anemia foram os mesmos que apresentaram maior quantidade de lesões derivadas de morte celular. Esses dados corroboram com a hipótese proposta na literatura, que as malformações esqueléticas e de tecidos moles e a letalidade embrionária e fetal resultam diretamente da redução dos eritroblastos embrionários e consequente redução da oxigenação tecidual. No entanto, ainda falta ser demonstrado integralmente que a depleção dos eritroblastos embrionários induzida pelos derivados da artemisinina é a ligação causal dos eventos que resultam em morte celular e dismorfogênese e não um efeito tóxico paralelo. Diversos estudos vêm sendo publicados relacionando os derivados da artemisinina com indução de apoptose, principalmente em células cancerígenas (EFFERTH *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2011; KONG *et al.*, 2012; REICHERT *et al.*, 2012; XIAO *et al.*, 2012). Com isso, a possibilidade da morte celular observada ter sido ocasionada por um efeito direto dos derivados da artemisinina sobre as células embrionárias também deve ser considerada.

6.4 Associação artesunato/mefloquina

Estudos não-clínicos sobre a segurança das combinações antimaláricas durante a gestação são raros. Uma exceção é o estudo publicado por Clark *et al.* (2004) sobre a toxicologia reprodutiva da associação clorproguanil-dapsona e artesunato em ratos e coelhos, onde não foram observadas alterações relevantes nos efeitos tóxicos do artesunato sobre os embriões a associação ao clorproguanil-dapsona. O presente estudo não mostra evidências de potencialização nos efeitos tóxicos da associação artesunato-mefloquina quando comparados ao artesunato isolado, pelo contrário, os resultados dessa tese sugerem que a toxicidade do artesunato sobre os embriões pode ser atenuada quando coadministrada com a mefloquina. Não existem evidências de efeitos antagônicos entre o artesunato e a mefloquina nos estudos publicados sobre a eficácia e a farmacocinética dessas drogas quando realizados em pacientes não-grávidas (DAVIS *et al.*, 2007). No entanto, durante a gestação pode haver alterações na farmacocinética das drogas, com modificações principalmente na distribuição e metabolismo. Os derivados da artemisinina são indutores enzimáticos de diversas famílias do citocromo P450. Além disso, o alvo da ação tóxica do artesunato sobre os embriões são os eritroblastos primitivos, que são muito mais sensíveis aos derivados da artemisinina que os eritroblastos adultos (CLARK, 2009). A possível ação da mefloquina sobre os efeitos tóxicos do artesunato pode ocorrer em nível celular, no entanto, para comprovar essa hipótese, mais estudos sobre os mecanismos toxicinéticos e toxicodinâmicos dessa interação são necessários.

A associação artesunato-mefloquina é efetiva e indispensável para o tratamento antimalárico, mas a exposição durante a gestação pode induzir perdas pós-implantação e malformações, principalmente no início da gestação. Nas doses avaliadas nesse estudo, exposição ao artesunato induziu embrioletalidade e alterações teratológicas e histopatológicas nas ninhadas; e a exposição à mefloquina resultou em indícios de toxicidade materna e poucos casos de hidrocefalia em embriões. A associação dos dois antimaláricos, no entanto, não aumentou a toxicidade embrionária e fetal ou materna em relação à administração isolada. Por outro lado, os resultados sugerem que a toxicidade do artesunato é atenuada de alguma forma quando associado à mefloquina. Da mesma maneira, os efeitos tóxicos observados com a administração da mefloquina isoladamente, não

foram observados após a associação com o artesunato. O modo pelo qual a associação artesunato/mefloquina reduziu a toxicidade destes antimaláricos sobre o embrião permanece inexplicada. Como os estudos clínicos com voluntários saudáveis do sexo masculino (DAVIS *et al.*, 2007) demonstraram que a mefloquina não altera a cinética do artesunato e da DHA, uma possível explicação seria a interferência da mefloquina na transferência transplacentária de DHA para o embrião. Interações em nível toxicodinâmico também não podem ser excluídas. Devido ao fato de, atualmente, a terapia antimalária ser dependente de associações com derivados da artemisinina, e também devido à grande incidência de morbidade e mortalidade da malária *falciparum* na gravidez, os mecanismos pelos quais a mefloquina e o artesunato interagem durante a gestação merecem ser investigados mais profundamente.

7. CONCLUSÕES

Neste estudo foi investigada a toxicologia reprodutiva do artesunato, da mefloquina e da sua associação sobre embriões expostos *in utero* nos dias gestacionais 9 a 11 e avaliados nos dias 12 e 20 de gestação:

- O tratamento com artesunato e com a associação artesunato/mefloquina, em ambas as doses avaliadas, e com a mefloquina na dose de 30 mg/kg/dia não acarretou toxicidade materna.
- O tratamento com mefloquina na dose de 80 mg/kg/dia induziu redução no ganho de massa corporal das progenitoras logo após o tratamento, indicando toxicidade materna.
- As dosagens de progesterona e testosterona plasmáticas das progenitoras não indicaram alterações no balanço hormonal no dia gestacional 12 em todos os grupos avaliados.
- A administração de artesunato nas doses de 15 e 40mg/kg e da associação artesunato/mefloquina nas doses de 15/30 mg/kg e 40/80 mg/kg nos dias 9-11 induziu efeitos deletérios tanto sobre os embriões no dia de gestação 12, quanto sobre os fetos no dia 20 de gestação. Causando maior letalidade nos fetos no dia gestacional 20.
- A exposição dos embriões à mefloquina, em ambas as doses avaliadas, não resultou em alterações teratológicas nos fetos no dia gestacional 20 e resultou em poucos casos de hidrocefalia nos embriões no dia gestacional 12, sem outras alterações histopatológicas.
- Os resultados das análises teratológicas e histopatológicas dos embriões expostos ao artesunato isolado e à associação artesunato/mefloquina demonstram alterações marcantes, porém com menor intensidade nos animais tratados com a associação.

Concluindo, tanto o artesunato isolado quanto a associação artesunato/mefloquina são tóxicos para gestação em ratas Wistar, quando administrados no período de 9 a 11 de gestação. A associação do artesunato com a mefloquina resulta em toxicidade inferior a desses medicamentos isolados.

REFERÊNCIAS

- ADAM, I.; ALI, D. M.; ABDALLA, M. A. Artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria during pregnancy in eastern Sudan. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 100, n. 7, p. 632-5, Jul 2006.
- ADAM, I. *et al.* Artemether in the treatment of falciparum malaria during pregnancy in eastern Sudan. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 98, n. 9, p. 509-13, Sep 2004.
- ALKADI, H. O. Antimalarial drug toxicity: a review. **Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 385-91, 2007.
- AMBLER, M. T. *et al.* The neurological assessment in young children treated with artesunate monotherapy or artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Malar J**, v. 8, p. 207, 2009.
- ASHLEY, E. *et al.* Malaria. **Travel Med Infect Dis**, v. 4, n. 3-4, p. 159-73, May-Jul 2006.
- ASHLEY, E. A. *et al.* Randomized, controlled dose-optimization studies of dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated multidrug-resistant falciparum malaria in Thailand. **J Infect Dis**, v. 190, n. 10, p. 1773-82, Nov 15 2004.
- ASHLEY, E. A. *et al.* A randomized, controlled study of a simple, once-daily regimen of dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated, multidrug-resistant falciparum malaria. **Clin Infect Dis**, v. 41, n. 4, p. 425-32, Aug 15 2005.
- AVERY, M. A. *et al.* Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 7. Direct modification of (+)-artemisinin and in vivo antimalarial screening of new, potential preclinical antimalarial candidates. **J Med Chem**, v. 45, n. 19, p. 4321-35, Sep 12 2002.
- BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S. G., S.L.; BERNARDI, M.M. (Ed.). **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.691-699.
- BERNET, D. S., H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 22-34, 1999.
- BIALEK, R.; KNOBLOCH, J. [Parasitic infections in pregnancy and congenital protozoan infections. Part I.: Protozoan infections]. **Z Geburtshilfe Neonatol**, v. 203, n. 2, p. 55-62, Mar-Apr 1999.
- BOARETO, A. C. *et al.* Toxicity of artemisinin [*Artemisia annua* L.] in two different periods of pregnancy in Wistar rats. **Reprod Toxicol**, v. 25, n. 2, p. 239-46, Feb 2008.
- BOUDREAU, E. F. *et al.* Mefloquine kinetics in cured and recrudescing patients with acute falciparum malaria and in healthy volunteers. **Clin Pharmacol Ther**, v. 48, n. 4, p. 399-409, Oct 1990.
- BRABIN, B.; PIPER, C. Anaemia- and malaria-attributable low birthweight in two populations in Papua New Guinea. **Ann Hum Biol**, v. 24, n. 6, p. 547-55, Nov-Dec 1997.
- BURK, O. *et al.* Antimalarial artemisinin drugs induce cytochrome P450 and MDR1

expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. **Mol Pharmacol**, v. 67, n. 6, p. 1954-65, Jun 2005.

CLARK, R. L. Embryotoxicity of the artemisinin antimalarials and potential consequences for use in women in the first trimester. **Reprod Toxicol**, v. 28, n. 3, p. 285-96, Nov 2009.

CLARK, R. L. *et al.* Artesunate: developmental toxicity and toxicokinetics in monkeys. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v. 83, n. 4, p. 418-34, Aug 2008b.

CLARK, R. L. *et al.* Developmental toxicity of artesunate in the rat: comparison to other artemisinins, comparison of embryotoxicity and kinetics by oral and intravenous routes, and relationship to maternal reticulocyte count. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v. 83, n. 4, p. 397-406, Aug 2008a.

CLARK, R. L. *et al.* Developmental toxicity of artesunate and an artesunate combination in the rat and rabbit. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v. 71, n. 6, p. 380-94, Dec 2004.

CUMANO, A.; GODIN, I. Ontogeny of the hematopoietic system. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 745-85, 2007.

DAVIS, T. M. *et al.* Assessment of the effect of mefloquine on artesunate pharmacokinetics in healthy male volunteers. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 3, p. 1099-101, Mar 2007.

DEEN, J. L.; VON SEIDLEIN, L. Antimalarial use during pregnancy and its effect on birthweight. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 96, n. 5, p. 573-4, Sep-Oct 2002.

DEEN, J. L. *et al.* The safety of the combination artesunate and pyrimethamine-sulfadoxine given during pregnancy. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 95, n. 4, p. 424-8, Jul-Aug 2001.

DELLICOUR, S. *et al.* The safety of artemisinins during pregnancy: a pressing question. **Malar J**, v. 6, p. 15, 2007.

DESAI, M. *et al.* Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 2, p. 93-104, Feb 2007.

DESJARDINS, R. E. *et al.* Kinetics of a new antimalarial, mefloquine. **Clin Pharmacol Ther**, v. 26, n. 3, p. 372-9, Sep 1979.

EFFERTH, T. *et al.* Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells. **PLoS One**, v. 2, n. 8, p. e693, 2007.

GAO, X. *et al.* Dihydroartemisinin induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in HepG2 human hepatoma cells. **Tumori**, v. 97, n. 6, p. 771-80, Nov-Dec 2011.

GREENWOOD, B.; MUTABINGWA, T. Malaria in 2002. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 670-2, Feb 7 2002.

GUPTA, M. M. *et al.* Isolation of a high artemisinic acid containing plant of *Artemisia annua*. **Planta Med**, v. 62, n. 3, p. 280-1, Jun 1996.

HAYNES, R. K.; KRISHNA, S. Artemisinins: activities and actions. **Microbes Infect**, v. 6, n. 14, p. 1339-46, Nov 2004.

HIEN, T. T.; WHITE, N. J. Qinghaosu. **Lancet**, v. 341, n. 8845, p. 603-8, Mar 6 1993.

KALILANI, L. *et al.* A randomized controlled pilot trial of azithromycin or artesunate added to sulfadoxine-pyrimethamine as treatment for malaria in pregnant women. **PLoS One**, v. 2, n. 11, p. e1166, 2007.

KONG, R. *et al.* Dihydroartemisinin enhances Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis in pancreatic cancer cells via ROS-mediated up-regulation of death receptor 5. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37222, 2012.

KRISHNA, S.; UHLEMANN, A. C.; HAYNES, R. K. Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. **Drug Resist Updat**, v. 7, n. 4-5, p. 233-44, Aug-Oct 2004.

LEVINE, B. S.; PARKER, R. M. Reproductive and developmental toxicity studies of pyridostigmine bromide in rats. **Toxicology**, v. 69, n. 3, p. 291-300, 1991.

LI, Z. L. [Teratogenicity of sodium artesunate]. **Zhong Yao Tong Bao**, v. 13, n. 4, p. 42-4, 63-4, Apr 1988.

LIM, P. *et al.* Pfmdr1 copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in falciparum malaria in Cambodia. **Malar J**, v. 8, p. 11, 2009.

LINDSAY, S. *et al.* Effect of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes. **Lancet**, v. 355, n. 9219, p. 1972, Jun 3 2000.

LONGO, M. *et al.* Effects of the antimalarial drug dihydroartemisinin (DHA) on rat embryos in vitro. **Reprod Toxicol**, v. 21, n. 1, p. 83-93, Jan 2006.

LONGO, M. *et al.* In vivo and in vitro investigations of the effects of the antimalarial drug dihydroartemisinin (DHA) on rat embryos. **Reprod Toxicol**, v. 22, n. 4, p. 797-810, Nov 2006.

LUZZI, G. A.; PETO, T. E. Adverse effects of antimalarials. An update. **Drug Saf**, v. 8, n. 4, p. 295-311, Apr 1993.

MCGREADY, R. *et al.* Randomized comparison of mefloquine-artesunate versus quinine in the treatment of multidrug-resistant falciparum malaria in pregnancy. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 94, n. 6, p. 689-93, Nov-Dec 2000.

MCGREADY, R. *et al.* Artemisinin derivatives in the treatment of falciparum malaria in pregnancy. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 92, n. 4, p. 430-3, Jul-Aug 1998.

MCGREADY, R. *et al.* Artemisinin antimalarials in pregnancy: a prospective treatment study of 539 episodes of multidrug-resistant Plasmodium falciparum. **Clin Infect Dis**, v. 33, n. 12, p. 2009-16, Dec 15 2001.

MCGREADY, R. *et al.* The pharmacokinetics of artemether and lumefantrine in pregnant women with uncomplicated falciparum malaria. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 62, n. 12, p. 1021-31, Dec 2006.

MCGREADY, R. *et al.* Pharmacokinetics of dihydroartemisinin following oral artesunate treatment of pregnant women with acute uncomplicated falciparum malaria. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 62, n. 5, p. 367-71, May 2006.

MCGREADY, R. *et al.* A randomised controlled trial of artemether-lumefantrine versus

artesunate for uncomplicated plasmodium falciparum treatment in pregnancy. **PLoS Med**, v. 5, n. 12, p. e253, Dec 23 2008.

MESHNICK, S. R.; TAYLOR, T. E.; KAMCHONWONGPAISAN, S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. **Microbiol Rev**, v. 60, n. 2, p. 301-15, Jun 1996.

MORRIS, C. A. et al. Population pharmacokinetics of artesunate and dihydroartemisinin in pregnant and non-pregnant women with malaria. **Malar J**, v. 10, p. 114, 2011.

MS. **Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2007**. Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde 2009.

_____. **Brasil registra queda de casos de malária**. Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde 2010a.

_____. **Guia Prático de tratamento da malária no Brasil**. Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde 2010b.

MUTABINGWA, T. K. et al. Randomized trial of artesunate+amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine+amodiaquine, chlorproguanil-dapsone and SP for malaria in pregnancy in Tanzania. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. e5138, 2009.

NEVILL, A. M. The need to scale for differences in body size and mass: an explanation of Kleiber's 0.75 mass exponent. **J Appl Physiol**, v. 77, n. 6, p. 2870-3, Dec 1994.

NOEDL, H. Artemisinin resistance: how can we find it? **Trends Parasitol**, v. 21, n. 9, p. 404-5, Sep 2005.

NOSTEN, F.; HIEN, T. T.; WHITE, N. J. Use of artemisinin derivatives for the control of malaria. **Med Trop (Mars)**, v. 58, n. 3 Suppl, p. 45-9, 1998.

NOSTEN, F. et al. Antimalarial drugs in pregnancy: a review. **Curr Drug Saf**, v. 1, n. 1, p. 1-15, Jan 2006.

NOSTEN, F.; PRICE, R. N. New antimalarials. A risk-benefit analysis. **Drug Saf**, v. 12, n. 4, p. 264-73, Apr 1995.

NOSTEN, F. et al. Mefloquine prophylaxis prevents malaria during pregnancy: a double-blind, placebo-controlled study. **J Infect Dis**, v. 169, n. 3, p. 595-603, Mar 1994.

NOSTEN, F. et al. The effects of mefloquine treatment in pregnancy. **Clin Infect Dis**, v. 28, n. 4, p. 808-15, Apr 1999.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malar J**, v. 9, p. 115, 2010.

OLLIARO, P. L. et al. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. **Trends Parasitol**, v. 17, n. 3, p. 122-6, Mar 2001.

ONYAMBOKO, M. A. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of artesunate and dihydroartemisinin following oral treatment in pregnant women with asymptomatic Plasmodium falciparum infections in Kinshasa DRC. **Malar J**, v. 10, p. 49, 2011.

PALIS, J.; YODER, M. C. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. **Exp Hematol**, v. 29, n. 8, p. 927-36, Aug 2001.

PALMER, K. J.; HOLLIDAY, S. M.; BROGDEN, R. N. Mefloquine. A review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 45, n. 3, p. 430-75, Mar 1993.

PARAPINI, S. *et al.* Evidence that haem iron in the malaria parasite is not needed for the antimalarial effects of artemisinin. **FEBS Lett**, v. 575, n. 1-3, p. 91-4, Sep 24 2004.

PHILLIPS-HOWARD, P. A.; WOOD, D. The safety of antimalarial drugs in pregnancy. **Drug Saf**, v. 14, n. 3, p. 131-45, Mar 1996.

PIOLA, P. *et al.* Supervised versus unsupervised intake of six-dose artemether-lumefantrine for treatment of acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Mbarara, Uganda: a randomised trial. **Lancet**, v. 365, n. 9469, p. 1467-73, Apr 23-29 2005.

POSNER, G. H. *et al.* Anticancer and antimalarial efficacy and safety of artemisinin-derived trioxane dimers in rodents. **J Med Chem**, v. 47, n. 5, p. 1299-301, Feb 26 2004.

PRICE, R. *et al.* Pharmacokinetics of mefloquine combined with artesunate in children with acute *falciparum* malaria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 2, p. 341-6, Feb 1999.

PRICE, R. N. *et al.* Artesunate/mefloquine treatment of multi-drug resistant *falciparum* malaria. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 91, n. 5, p. 574-7, Sep-Oct 1997.

REICHERT, S. *et al.* A radiosensitizing effect of artesunate in glioblastoma cells is associated with a diminished expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin. **Radiother Oncol**, v. 103, n. 3, p. 394-401, Jun 2012.

RIBEIRO, I. R.; OLLIARO, P. Safety of artemisinin and its derivatives. A review of published and unpublished clinical trials. **Med Trop (Mars)**, v. 58, n. 3 Suppl, p. 50-3, 1998.

ROCHE. **Lariam® - Mefloquine Hydrochloride**: Roche Laboratories Inc. 2009.

ROGERS, W. O. *et al.* Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia. **Malar J**, v. 8, p. 10, 2009.

ROGERSON, S. J. Malaria in pregnancy and the newborn. **Adv Exp Med Biol**, v. 659, p. 139-52, 2010.

SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 680-5, Feb 7 2002.

SCHLAGENHAUF, P. Mefloquine for malaria chemoprophylaxis 1992-1998: a review. **J Travel Med**, v. 6, n. 2, p. 122-33, Jun 1999.

SCHLAGENHAUF, P. *et al.* The position of mefloquine as a 21st century malaria chemoprophylaxis. **Malar J**, v. 9, p. 357, 2010.

SCHLAGENHAUF, P. *et al.* Pregnancy and fetal outcomes after exposure to mefloquine in the pre- and periconception period and during pregnancy. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 11, p. e124-31, Jun 2012.

SCHMIDT, L. H. *et al.* Antimalarial activities of various 4-quinolonemethanols with special

attention to WR-142,490 (mefloquine). **Antimicrob Agents Chemother**, v. 13, n. 6, p. 1011-30, Jun 1978.

SHAPIRO, T. A.; GOLDBERG, D. D. Quimioterapia das infecções parasitárias. In: BRUNTON, L. L. (Ed.). **Goodman e Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2010.

SIMPSON, J. A. *et al.* Population pharmacokinetics of mefloquine in patients with acute falciparum malaria. **Clin Pharmacol Ther**, v. 66, n. 5, p. 472-84, Nov 1999.

SMOAK, B. L. *et al.* The effects of inadvertent exposure of mefloquine chemoprophylaxis on pregnancy outcomes and infants of US Army servicewomen. **J Infect Dis**, v. 176, n. 3, p. 831-3, Sep 1997.

SOLOMON, H. M. *et al.* Spontaneous and induced alterations in the cardiac membranous ventricular septum of fetal, weanling, and adult rats. **Teratology**, v. 55, n. 3, p. 185-94, Mar 1997.

STAPLES, R. Detection of visceral alterations in mammalian fetuses. **Teratology**, v. 9, p. 37-38, 1974.

STEKETEE, R. W. *et al.* Malaria treatment and prevention in pregnancy: indications for use and adverse events associated with use of chloroquine or mefloquine. **Am J Trop Med Hyg**, v. 55, n. 1 Suppl, p. 50-6, 1996.

SULLIVAN, D. J., JR. *et al.* A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. **J Biol Chem**, v. 273, n. 47, p. 31103-7, Nov 20 1998.

TAVASSOLI, M. Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview. **Blood Cells**, v. 17, n. 2, p. 269-81; discussion 282-6, 1991.

TOOVEY, S. Mefloquine neurotoxicity: a literature review. **Travel Med Infect Dis**, v. 7, n. 1, p. 2-6, Jan 2009.

UHLEMANN, A. C. *et al.* A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. **Nat Struct Mol Biol**, v. 12, n. 7, p. 628-9, Jul 2005.

US-EPA. **Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. EPA/630/R-96/009**. Washington: US - Environmental Protection Agency 1996.

VAN AGTMAEL, M. A.; EGGELTE, T. A.; VAN BOXTEL, C. J. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. **Trends Pharmacol Sci**, v. 20, n. 5, p. 199-205, May 1999.

VANHAUWERE, B.; MARADIT, H.; KERR, L. Post-marketing surveillance of prophylactic mefloquine (Lariam) use in pregnancy. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58, n. 1, p. 17-21, Jan 1998.

WANG, T. Y. Follow-up observation on the therapeutic effects and remote reactions of artemisinin (Qinghaosu) and artemether in treating malaria in pregnant woman. **J Tradit Chin Med**, v. 9, n. 1, p. 28-30, Mar 1989.

WARD, S. A. *et al.* Antimalarial drugs and pregnancy: safety, pharmacokinetics, and

pharmacovigilance. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 2, p. 136-44, Feb 2007.

WHITE, N. J. Preventing antimalarial drug resistance through combinations. **Drug Resist Updat**, v. 1, n. 1, p. 3-9, Mar 1998.

WHITE, N. J. Delaying antimalarial drug resistance with combination chemotherapy. **Parassitologia**, v. 41, n. 1-3, p. 301-8, Sep 1999.

WHITE, T. E. *et al.* Artesunate-induced depletion of embryonic erythroblasts precedes embryoletality and teratogenicity in vivo. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v. 77, n. 5, p. 413-29, Oct 2006.

WHITE, T. E.; CLARK, R. L. Sensitive periods for developmental toxicity of orally administered artesunate in the rat. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v. 83, n. 4, p. 407-17, Aug 2008.

WHO. **A strategic framework for malaria prevention and control during pregnancy in the African region**. Brazzaville: World Health Organization Regional Office for Africa 2004.

_____. **Assessment of the safety of artemisinin compounds in pregnancy**. Geneva: World Health Organization 2006a.

_____. World Health Organization Guidelines for the treatment of malaria. 2006b. Disponível em: < <http://www.who.int/malaria/docs/TreatmentGuidelines2006.pdf> >.

_____. **Guidelines for the treatment of malaria**. Geneva: World Health Organization 2010.

_____. World Malaria Report 2011 - Fact Sheet. 2011. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html> >. Acesso em: January 20th.

WILAIRATANA, P. *et al.* The future outlook of antimalarial drugs and recent work on the treatment of malaria. **Arch Med Res**, v. 33, n. 4, p. 416-21, Jul-Aug 2002.

WOLFE, M. S.; CORDERO, J. F. Safety of chloroquine in chemosuppression of malaria during pregnancy. **Br Med J (Clin Res Ed)**, v. 290, n. 6480, p. 1466-7, May 18 1985.

WONGSRICHANALAI, C.; MESHNICK, S. R. Declining artesunate-mefloquine efficacy against falciparum malaria on the Cambodia-Thailand border. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 5, p. 716-9, May 2008.

XIAO, F. *et al.* Amplification activation loop between caspase-8 and -9 dominates artemisinin-induced apoptosis of ASTC-a-1 cells. **Apoptosis**, v. 17, n. 6, p. 600-11, Jun 2012.

XU, J. H.; ZHANG, Y. P. [Contraceptational effects of dihydroartemisinin and artesunate]. **Yao Xue Xue Bao**, v. 31, n. 9, p. 657-61, 1996.